Zur Chemie und Pharmakologie von Potentilla anserina

\- - -

Über die Natur des Sterins aus Potentilla anserina

\- - -

Qualitative und quantitative Papierchromatographie aliphatischer Aldehyde und Ketone

---

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t

verfasst und einer

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur Erlangung der

venia legendi

vorgelegt

von

Dr.rer.nat.

P a u l T u n m a n n

Assistent am Institut für Pharmazie
und Lebensmittelchemie
W ü r z b u r g

1956

Sonderdruck aus
„Archiv der Pharmazie“
287./59. Band, Heft 7, Seite 392—404
Verlag Chemie, G. m. b. H., Weinheim / Bergstraße

Habilitationsschrift
30. 1. 57

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

1329. Paul Tunmann

Zur Chemie und Pharmakologie von Potentilla anserina

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. *R. Dietzel*

(Eingegangen am 26. April 1954)

Im Jahre 1933 veröffentlichten *Schneider* und *Nevinny*[1]) die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfung eines 10%igen Dekoktes des Gänsefingerkrautes Potentilla anserina L. am isolierten Uterus. Sie stellten fest, daß am normalen Organ der Ratte, des Kaninchens, des Meerschweinchens und der Katze eine ausgeprägte Wirkung im Sinne einer Tonussteigerung und einer Auslösung lebhafter Kontraktionen eintrat, und daß der durch Barium in Krampf versetzte isolierte Uterus durch das Dekokt unter Erweckung erhöhter Peristaltik gelöst wurde. Die Wirkung war durch Tyrodelösung auswaschbar.

Dieser pharmakologische Untersuchungsbefund führte zur klinischen Prüfung der Droge. Dabei konnten *Hauptstein*[2]), *v. Haußen*[3]), *Weiß*[4]) u. a. gute Erfolge bei der Behandlung verschiedener Dysmenorrhoefälle erzielen.

Vorliegende Arbeit hat zur Aufgabe:

1. die petrolätherlöslichen Bestandteile der Droge zu isolieren und zu identifizieren und

Für die Überlassung der zur Untersuchung notwendigen Drogenmengen bin ich der *Kneipp-Heilmittelzentrale* Würzburg, zu Dank verbunden.

[1]) Zbl. Gynäkol. *57*, 2196 (1933).
[2]) Dtsch. med. Wschr. *62*, 1417 (1936).
[3]) Hippokrates *9*, 797 (1938).
[4]) Hippokrates *11*, 842 (1940).

2. zu untersuchen, welchen Stoffen die spasmolytische Wirkung des Aceton- und des Essigesterauszuges zukommt.

Über die basischen Inhaltsstoffe der Droge wird an anderer Stelle berichtet.

Eine eingehende chemische Untersuchung hat die Droge lange Zeit nicht erfahren. *Kroeber*[5]) schreibt, daß sich der Chemismus des Gänsefingerkrautes wohl im allgemeinen mit dem der ihm verwandten Potentilla tormentilla deckt, die 20—30% Tormentillgerbsäure enthalten soll. Nach *Kosch*[6]), *Peyer*[7]) und *Czetsch-Lindenwald*[8]) liegt der Gerbstoffgehalt bei 7—10%. *Gillot* und *Wioland*[9]) finden in den unterirdischen Teilen der Pflanze Tormentol, eine Verbindung, die zuerst von *Goris* und *Vischniak*[10]) aus Potentilla tormentilla Neck. isoliert worden ist und hydrolytisch in eine Säure (Schmp. 280°) und einen Alkohol (Schmp. 310°) gespalten werden kann. *Roberg*[11]) berichtet, daß die Droge saponinfrei ist und nach *Orechoff*[12]) enthält sie keine Alkaloide. *Klein* und *Werner*[13]) können Flavone nachweisen. *Thoms*[14]) und *Seel*[15]) sprechen von noch unbekannten Bestandteilen, während *Czetsch-Lindenwald* (l. c.) die Anwesenheit nicht näher definierter kochbeständiger Substanzen hervorhebt. *Herrmann*[16]) berichtet von einem Wachs, dessen Alkoholkomponente ein Alkohol vom Schmp. 78° (Cerylalkohol) ist, von einem Paraffin (?) mit dem Schmp. 64° und gibt die Anwesenheit von Fett und Phytosterin an. Aus dem Alkoholextrakt erhält er nach *Stas-Otto* neben Gerbstoff Cholin, Gallussäure und Ellagsäure (aus dem Gerbstoff) und an Flavonolen Quercitrin und Querzetin. Alkaloide, Saponine und Tormentol kann er nicht nachweisen. Die therapeutische Wirkung wird von nahezu allen Bearbeitern den Gerbstoffen zugeschrieben.

Der Petrolätherauszug

Unter Verwendung von Drogen verschiedener Provenienzen werden etwa 2% petrolätherlösliche (Fraktion 45°—68°) Bestandteile abgeschieden, die hinsichtlich ihrer Zusammensetzung keine nennenswerten Unterschiede aufweisen. Die physikalischen Konstanten und chemischen Kennzahlen sind:

Spez. Gewicht	0,8857	Esterzahl	46,7
$n_D^{70°}$	1,4649	Jodzahl	126,4
Säurezahl	76,2	Unverseifbare Bestandteile	27,4%
Verseifungszahl	122,9	Jodzahl der unvers. Bestandteile	92,2

Bemerkenswert ist die hohe Säurezahl, während die niedrige Verseifungszahl durch den ungewöhnlich hohen Gehalt an unverseifbaren Bestandteilen bedingt ist. Die Jodzahlen lassen erkennen, daß neben ungesättigten Verbindungen im unverseifbaren Teil ungesättigte Fettsäuren vorhanden sind.

---

[5]) Pharmaz. Ztg. *73*, 123 (1928).
[6]) Handbuch d. deutsch. Arzneipfl., Vlg. Springer, Berlin 1939.
[7]) Süddtsch. Apotheker-Ztg. *81*, 195.
[8]) Pflanzliche Arzneizubereitungen, Vlg. Süddtsch. Apotheker-Ztg., 1943.
[9]) Bull. Soc. chim. biolog. *14*, 313 (1932).
[10]) Compt. rend. Acad. Sciences *160*, 77 (1915).
[11]) Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. *275*, 145 (1937).
[12]) Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. *272*, 673 (1934).
[13]) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. *143*, 11 (1925).
[14]) Handbuch der prakt. u. wiss. Pharmazie, Vlg. Urban u. Schwarzenberg, Berlin, Wien 1931.
[15]) Dtsch. Heilpflanze *10*, 25 (1944).
[16]) Pharmaz. Zentralhalle (Deutschland) *88*, 303 (1949); Dissertation Halle 1948.

In Petroläther lösliche Fettsäuren

An in Petroläther löslichen Fettsäuren werden nach Abtrennung der unverseifbaren Bestandteile im Mittel 58,1% festgestellt. Ihre Kennzahlen sind:

Säurezahl	188,9	Jodzahl	139,3
Mittleres Molekulargewicht	297,3	Rhodanzahl	98,6

Die nach der Methode von *Twitchell* ausgeführte Trennung liefert im Mittel 25,4% feste und 66,0% flüssige Fettsäuren. Die Jodzahl der festen Fettsäuren zeigt, daß die Methode nicht sehr genau arbeitet. Jedoch können durch wiederholtes Umkristallisieren die festen Fettsäuren rein erhalten werden.

Ihre Kennzahlen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1

Kennzahlen	Feste Fettsäuren	Flüssige Fettsäuren
Säurezahl	202,2	192,4
Mittleres Molekulargewicht	277,5	291,6
Jodzahl	3,3	162,6

Zur Identifizierung werden die festen Fettsäuren nach der Methode von *Heintz* als Magnesiumsalze fraktioniert gefällt und durch wiederholtes Umkristallisieren gereinigt. Dabei wird aus dem nicht gelösten Fettsäureanteil Arachinsäure neben geringen Mengen Cerotinsäure nachgewiesen. Die 1. und 2. Fraktion der Fällung besteht ebenfalls aus Arachinsäure, die durch Schmelzpunkt und Elementaranalyse identifiziert wird. Die 3. und 4. Fraktion enthält im wesentlichen Palmitinsäure und die 5. und 6. Fraktion Myristinsäure. Die Säuren werden durch Bestimmung der Schmelzpunkte, der Mischschmelzpunkte mit authentischem Material, Ermittlung der eutektischen Temperatur mit Azobenzol und durch Elementaranalyse identifiziert.

Zum Nachweis der flüssigen Fettsäuren werden ihre Oxysäuren und Bromanlagerungsprodukte hergestellt. Erhalten werden Oxystearinsäure und Linusinsäure sowie nach dem Bromverfahren Tetrabromstearinsäure und Hexabromstearinsäure. Diese Ergebnisse lehren mithin, daß als flüssige, ungesättigte Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure zugegen sind.

Die unverseifbaren Bestandteile

Anteilmäßig können im Mittel 27,4% des Petrolätherextraktes nach den Verfahren von *Spitz-Hönig, Fahrion, Böhmer* und nach dem DAB 6 als unverseifbare Bestandteile abgeschieden werden. Diese zeigen positive Reaktionen auf Sterine *(Liebermann-Burchard, Hager-Salkowski)*. Die quantitative Bestimmung der mit Digitonin fällbaren Sterine ergibt im Mittel 16,67%. Aus dieser Fällung, die einheitlich ist, wird das reine Sterin isoliert und aus diesem verschiedene Derivate hergestellt:

Sterin	Schmp. 136°	Sterin-Benzoat	Schmp. 142°
Sterin-Azetat	„ 121,2°	Sterin-p-Nitrobenzoat	„ 188°

Das Azetat enthält eine Azetylgruppe. Aus der Elementaranalyse errechnet sich eine Summenformel von $C_{24}H_{40}O$. Das Absorptionsspektrum besitzt ein Maximum

bei 275 mμ. Bemerkenswert ist, daß das Sterin mit dem von *J. Zellner* und *Gärtner*[17]) aus der Buchenrinde erhaltenen identisch ist. Alle hergestellten Derivate besitzen den gleichen Schmelzpunkt und ebenso stimmt das Absorptionsmaximum, soweit dies aus dem angegebenen Spektrum erkennbar ist, mit überein (Abb. 1).

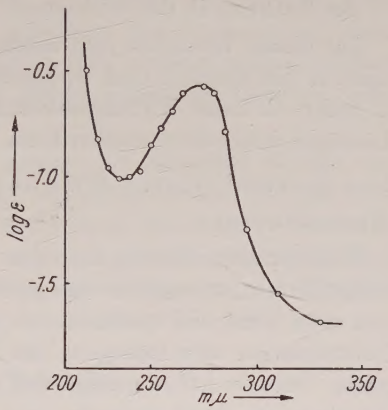


Abb. 1. UV-Absorptionsspektrum des Sterins (c = 0,948 g/l in Methanol)

Weitere Bestandteile des Unverseifbaren werden durch Adsorption an Aluminiumoxyd abgetrennt und isoliert. Aus den obersten Zonen der Säule wird reines Sterin vom Schmelzpunkt 136° erhalten, das identisch mit dem mittels Digitonin gefällten Sterin ist. Aus den unteren Zonen läßt sich Cerylalkohol mit einem Schmelzpunkt von 78° abscheiden und durch die Elementaranalyse nachweisen. Das Azetat zeigt den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt von 65°. Im Durchlauf findet sich wahrscheinlich n-Nonakosan, das den bekannten Schmelzpunkt von 64° zeigt. Auch die Verbrennungswerte stimmen mit den berechneten gut überein.

Über die Anwesenheit uteruswirksamer Glykoside in der Droge

Es ist wiederholt vermutet worden, daß die pharmakologische Wirkung der Droge und ihrer Extrakte Glykosiden oder Glykosidgemischen zuzuschreiben sei. Diese Ansicht wird vor allem dadurch bestärkt, daß es möglich ist, besonders wirksame Auszüge mit feuchtem Essigester zu erhalten, der bekanntlich ein gutes Lösungsmittel für Glykoside darstellt. Wenn auch eine Bestätigung dieser Annahme noch nicht gelungen ist, so glauben *Youngken* und Mitarbeiter[18]) an das Vorhandensein von Glykosiden, zumal sie einen kristallähnlichen, hygroskopischen Körper mit spasmolytischer Wirkung isolieren können, in der wirksamen Fraktion Glukose nachweisen und einen positiven *Molisch-* und *Tollens*-Test erhalten.

Diese Vermutung kann jedoch auf Grund folgender Versuche nicht bestätigt werden:

1. Aus den spasmolytisch wirkenden Fraktionen können Glykoside selbst nach schonendster Aufarbeitung der Droge nicht isoliert werden.
2. Aus den wirksamen Fraktionen wird weder nach enzymatischer Spaltung noch nach Hydrolyse mit Salzsäure bei einem p_H von 4 bzw. 2n-Schwefelsäure unter Verwendung eines Stickstoffstromes ein Aglukon erhalten.
3. Bei der Probe nach *Bourquelot* kann weder nach enzymatischer Spaltung noch nach saurer Hydrolyse eine Änderung der optischen Drehung gegenüber der Ausgangslösung beobachtet werden.

[17]) Mh. Chem. *47*, 151 (1926); vgl. *Clotofski* und *Herr*, Ber. dtsch. chem. Ges. *75*, 237 (1942).
[18]) *H. W. Youngken jr., A. C. Neva, H. J. Dauben jr., Y. W. Chang, E. Wenkert*, J. Amer. pharmac. Assoc. 448 (1949).

4. Der nach *Holzman* und Mitarb.[19]) in der verbesserten Ausführung von *Tscheche* und Mitarbeiter[20]) kolorimetrisch festgestellte Glukosegehalt ist vor und nach der Spaltung in den wirksamen Fraktionen der gleiche.

Aus diesen Versuchen geht eindeutig hervor, daß die Anwesenheit von Glykosiden in den spasmolytisch wirkenden Fraktionen ausgeschlossen ist. Dies gilt um so mehr, als keine Wirkungsänderung vor und nach der Hydrolyse der einzelnen Lösungen beobachtet werden kann, was in der Regel der Fall ist.

Die spasmolytische Wirkung des Azeton- und Essigesterauszuges

Azetonauszug

Wird der Azetonauszug nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels mit Wasser aufgenommen, so resultiert eine grünbraun gefärbte Flüssigkeit, die einen p_H-Wert von etwa 5 hat und spasmolytisch wirksam ist. Dieser Effekt verschwindet nach Neutralisation oder Reinigung des Auszuges mit basischem Bleiazetat. Umfangreiche Versuche haben gezeigt, daß die Wirkung von der Bernsteinsäure ausgeht, die als solche durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt mit authentischem Material und die Verbrennungswerte identifiziert wird. Teste mit reinen und neutralisierten Bernsteinsäurelösungen zeigen die gleichen Wirkungen.

Essigesterauszug

Im Gegensatz zum Azetonauszug besitzt der Essigesterauszug auch nach Reinigung mit basischem Bleiazetat eine starke spasmolytische Wirkung. Bei der Aufarbeitung des Auszugs zeigt sich zunächst, daß beim Einengen des neutralisierten und des unbehandelten Auszugs Wirkungsunterschiede auftreten. So ist der eingeengte neutralisierte Extrakt wirksamer als der entsprechende unbehandelte. Werden die Rückstände der eingeengten Auszüge mit Methanol behandelt, so treten Abscheidungen aus Kalium- und Kalziumsalzen auf, die den Wirkungsgrad der methanolhaltigen Lösung nicht beeinflussen.

Erst durch Fällung der konzentrierten Methanollösung mit einem Überschuß Chloroform werden wirksame Bestandteile abgeschieden, die aus kristallwasserhaltigem Natriumazetat bestehen. Dabei ist die Fällung des neutralisierten Auszugs wesentlich größer. Das Filtrat ist nunmehr wirkungslos.

Die Wirkung des Essigesterauszuges beruht also auf der Anwesenheit von Natriumazetat, das sich bei der Aufarbeitung des Auszuges gebildet hat. Sie kommt auf keinen Fall Glykosiden zu.

Über den Wert der Droge als Arzneimittel

Wenn ein Werturteil über die Droge gefällt werden soll, so muß eine strenge Scheidung zwischen der Auswertung der pharmakologischen Prüfungen am isolierten Organ und den klinischen Ergebnissen am Menschen vorgenommen werden.

Auf Grund meiner und gemeinsam mit *R. Janka*[21]) durchgeführten eingehenden chemischen und pharmakologischen Untersuchungen liegt als uteruserregend wir-

[19]) *G. Holzman, R. v. Mac Allister, C. Niemann,* J. biol. Chemistry *171,* 27 (1947).
[20]) *R. Tscheche, G. Grimmer, F. Neuwald,* Chem. Ber. *85,* 1103 (1952).
[21]) Dissertation Würzburg 1954.

kender Bestandteil nur Cholin vor. An spasmolytisch wirkenden Stoffen hingegen wird aus dem Azetonauszug, der sauer reagiert, Bernsteinsäure isoliert, die allerdings in neutralem Medium ohne Wirkung ist, während das auf dem Wege über die Herstellung des Essigesterauszugs gefundene Natriumazetat einen lähmend wirkenden Drogenbestandteil vortäuscht. Ein gewisser spasmolytischer Effekt kommt schließlich den in reichlicher Menge gefundenen Ammoniumsalzen zu.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse müssen die klinischen Erfolge, besonders bei Krampfzuständen, als problematisch angesehen werden. Dies gilt nicht für Spasmen im Magen- und Darmgebiet, die durch die in der Droge vorhandenen Gerbstoffe beeinflußt werden können. Sicher ist jedoch, daß die pharmakologisch am isolierten Organ geprüften Wirkstoffe nicht ausreichend sind, um klinische Erfolge zu erzielen.

Beschreibung der Versuche

Petrolätherauszug

Das Petrolätherextrakt wird durch erschöpfende Perkolation in einem Röhrenperkolator mit Petroläther (45—68°) hergestellt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand im Vakuum bei 70° getrocknet. Das Extrakt ist weich, von dunkelgrüner Farbe mit bräunlicher Tönung. Der Geruch ist angenehm aromatisch. Die Kennzahlen sind aus der Tabelle 2 zu ersehen.

Tabelle 2

Extrakt Einwaage mg	n/10-KOH ml	n/10-Bromlösung ml	Säurezahl	Verseifungszahl	Jodzahl
29,08	0,397	—	76,6	—	—
82,73	1,117	—	75,8	—	—
Säurezahl im Mittel:			76,2		
28,78	0,628	—	—	122,4	—
40,50	0,891	—	—	123,4	—
Verseifungszahl im Mittel:				122,9	
32,64	—	3,269	—	—	127,1
28,46	—	2,817	—	—	125,6
Jodzahl im Mittel:					126,4

In Petroläther lösliche Fettsäuren

Zur Bestimmung der in Petroläther löslichen Fettsäuren werden die nach der Abtrennung der unverseifbaren Bestandteile zurückgebliebenen Seifenlaugen mit den Waschwässern vereinigt und durch Erhitzen auf dem Wasserbad vom Weingeist befreit. Durch Ansäuern mit verd. Salzsäure scheiden sich dabei die Fettsäuren und Oxysäuren ab. Diese können mit Petroläther oder mit Äthyläther ausgeschüttelt werden. Wird Petroläther verwendet, so werden nur die eigentlichen Fettsäuren erhalten, während Äthyläther auch die Oxysäuren aufnimmt. Die Versuchsergebnisse sind der Tabelle 3 und die Kennzahlen der Fettsäuren der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 3

Extrakt Einwaage g	Gesamtsäuren g	Gesamtsäuren %	Fettsäuren g	Fettsäuren %	Oxysäuren %
2,3761	—	—	1,3551	57,0	—
2,3588	1,5702	66,6	1,3961	59,2	7,4

Tabelle 4

Fettsäuren Einwaage mg	n/10-KOH ml	n/10-Bromlösung ml	n/20-Rhodanlösung ml	Säurezahl	Jodzahl	Rhodanzahl
52,10	1,747	—	—	188,1	—	—
46,19	1,562	—	—	189,7	—	—
Säurezahl im Mittel:				188,9		
23,37	—	2,568	—	—	139,4	—
19,75	—	2,167	—	—	139,2	—
Jodzahl im Mittel:					139,3	
20,07	—	—	3,103	—	—	98,1
17,48	—	—	2,727	—	—	99,0
Rhodanzahl im Mittel:						98,6

Trennung der Gesamtfettsäuren in feste und flüssige Fettsäuren

Die Trennung der Fettsäuren in feste und flüssige wird nach *Twitchell* ausgeführt. Danach werden die festen Fettsäuren in alkoholischer Lösung als Bleisalze abgeschieden und durch Umkristallisieren gereinigt.

Die flüssigen Fettsäuren werden aus dem alkoholischen Filtrat, das bei der Trennung anfällt, bestimmt. Dieses wird unter vermindertem Druck im Stickstoffstrom eingeengt, die flüssigen Fettsäuren mit verd. Salpetersäure in Freiheit gesetzt und mit einem Gemisch von Äther und Petroläther (1 + 1) aufgenommen. Im Scheidetrichter wird die Lösung wiederholt mit Wasser gewaschen, und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum unter Verwendung eines Stickstoffstromes abdestilliert. Gehalt und Kennzahlen der festen und flüssigen Fettsäuren geben Tabellen 5 und 6 wieder.

Tabelle 5

Gesamtfettsäuren Einwaage	Feste Fettsäuren g	Feste Fettsäuren %	Flüssige Fettsäuren g	Flüssige Fettsäuren %
1,6356	0,4223	25,82	1,08	65,8
4,426	1,1103	25,09	2,93	66,1

Tabelle 6

Einwaage mg	n/10-KOH ml	n/10-Brom-lösung ml	Flüssige Fettsäuren Säurezahl	Flüssige Fettsäuren Jodzahl	Feste Fettsäuren Säurezahl	Feste Fettsäuren Jodzahl
22,2	0,800	—	—	—	202,2	—
25,83	0,931	—	—	—	202,2	—
28,37	—	0,074	—	—	—	3,3
17,06	0,585	—	192,4	—	—	—
16,92	—	2,17	—	162,8	—	—
27,37	—	3,50	—	162,3	—	—

Die gesättigten Fettsäuren

Zur Identifizierung der gesättigten Fettsäuren werden diese nach dem Verfahren von *Bertram* in der Ausführungsform von *J. Pritzker* und *R. Jungkunz*[22]) hergestellt:

Extrakt 2,81 g; 0,54 g gesättigte Fettsäuren: 19,2%
Extrakt 4,90 g; 0,96 g gesättigte Fettsäuren: 19,6%

Diese Fettsäuren (0,96 g) werden in 200 ml Alkohol durch Erwärmen gelöst. Nach dem Erkalten scheiden sich 0,32 g Fettsäuren ab, die einen Schmelzpunkt von 75—76° haben. Aus diesen kann durch wiederholtes Umkristallisieren in geringer Menge eine Fettsäure mit dem Schmelzpunkt von 83° isoliert werden. Das Bleisalz dieser Säure schmilzt bei 112,5—113,5°.

Die Eigenschaften der Säure und des Salzes sprechen für Cerotinsäure. Der Hauptanteil dieser Fettsäuren jedoch, ebenso wie der der 1. und 2. Fraktion (s. u.), besteht aus Arachinsäure.

Arachinsäure	Schmp.: 77°	gef.: 77°
$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	Mol.-Gew.: 312,51	Titration: 319,4
	Ber.: C 76,86%	H 12,90%
	Gef.: » 76,22%	» 12,85%

Aus dem Filtrat werden die Fettsäuren nach *W. Heintz*[23]) jeweils mit 2 ml einer Lösung von 0,24 g Magnesiumazetat in 20 ml Wasser fraktioniert gefällt. Nach jeder Fällung wird die Lösung konzentriert und die freie Säure mit 1—2 Tropfen Ammoniak neutralisiert. Die einzelnen Abscheidungen werden gewaschen und anschließend zerlegt. Folgende Fraktionen werden erhalten:

1. Fraktion	0,060 g	Schmp.	70,5°—71°
2. Fraktion	0,0746 „	„	69,5°
3. Fraktion	0,035 „	„	62,0°
4. Fraktion	0,0754 „	„	51,0°
5. Fraktion	0,098 „	„	51,5°
6. Fraktion	0,0608 „	„	51,3°
7. Fraktion	0,0876 „	„	45°

Die 3. Fraktion besteht aus Palmitinsäure, die 5. und 6. im wesentlichen aus Myristinsäure. Aus der 7. Fraktion gelingt es nicht, eine reine Fettsäure abzuscheiden. Die Säuren werden durch Bestimmung der Mischschmelzpunkte mit authentischem Material und Ermittlung der eutektischen Temperatur mit Azobenzol identifiziert.

Die ungesättigten Fettsäuren

Die ungesättigten flüssigen Fettsäuren werden zunächst nach der Methode von *Hazura*, die auf der Oxydation der Säuren mit Kaliumpermanganat zu Oxysäuren beruht, iden-

[22]) Pharmac. Acta Helvetiae *7*, 48 (1932).
[23]) J. prakt. Chem. *66*, 1 (1855).

tifiziert. Die flüssigen Fettsäuren (2,5 g) werden mit 3 ml Kalilauge, die 1,13 g Kaliumhydroxyd enthalten, neutralisiert. Nach Zusatz von 165 ml Wasser werden unter dauerndem Rühren in dünnem Strahle 165 ml einer 1,5%igen Kaliumpermanganatlösung zugegeben. 10 Min. später wird soviel schweflige Säure zugesetzt, bis die Lösung sauer geworden ist und das Mangandioxyd sich gelöst hat. Hierbei scheidet sich ein Niederschlag aus, der nach Filtration bei 100° getrocknet und zur Beseitigung von Nichtoxysäuren mit Petroläther extrahiert wird. Aus dem Rückstand kann einwandfrei die Dioxystearinsäure und damit das Vorhandensein der Ölsäure nachgewiesen werden.

Dioxystearinsäure:	Schmp.: 132—136,5°	gef.: 133°
	Mol.-Gew.: 316,3	Titration: 316,1

Nicht mit Sicherheit gelingt dagegen der Nachweis der Sativinsäure, so daß auf Linolsäure über die Bromverbindung geprüft wird (s. u.).

Als Linusinsäure kann jedoch die Linolensäure erkannt werden. Die bei der Oxydation anfallenden wasserlöslichen Produkte werden mit Kalilauge neutralisiert. Nach dem Einengen auf 25 ml wird mit Schwefelsäure angesäuert, die ausfallenden Säuren abgetrennt und lufttrocken mit Äther extrahiert, der sekundäre Oxydationsprodukte löst. Der verbleibende Rückstand enthält Linusinsäure.

Linusinsäure:	Schmp.: 203—205°	gef.: 204,5°
	Mol.-Gew.: 380,3	Titration: 379,9

Um einen eindeutigen Nachweis der Linolsäure zu führen, werden die flüssigen Fettsäuren in Bromderivate übergeführt: Etwa 2 g flüssige Fettsäuren werden nach Lösung in 20 ml Petroläther solange mit einer 5%igen Lösung von Brom in Petroläther versetzt, bis die Bromfärbung nicht mehr verschwindet. Nun stellt man auf Eis. Die dabei auftretende Fällung wird abfiltriert und der Niederschlag mit gekühltem Petroläther ausgewaschen. Dieser Niederschlag enthält neben Hexabromstearinsäure, die den bereits erbrachten Nachweis von Linolensäure erhärtet, Tetrabromstearinsäure, so daß damit der Nachweis der Linolsäure erbracht ist.

Hexabromstearinsäure:	Schmp.: 179°	gef.: 180°
$C_{18}H_{30}O_2Br_6$	Ber.: Br 63,32%	gef.: 63,50%
Tetrabromstearinsäure:	Schmp.: 114°	gef.: 114°
$C_{18}H_{32}O_2Br_4$	Ber.: Br 53,33%	gef.: 53,06%

Die unverseifbaren Bestandteile

Die Bestimmung der unverseifbaren Bestandteile des Petrolätherextraktes wird nach den Methoden von *Spitz-Hönig*[24]), *Fahrion* und nach dem DAB. 6 durchgeführt. Größere Mengen an Unverseifbarem werden nach dem Verfahren von *A. Böhmer*[25]) gewonnen. Der Gehalt an unverseifbaren Bestandteilen im Extrakt ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7

Extrakt Einwaage g	Unverseifbare Bestandteile g	%	Methode
2,376	0,6583	27,71	*Spitz-Hönig* (Petroläther)
1,4804	0,3917	26,46	*Fahrion* (Äthyläther)
0,5885	0,1647	27,99	DAB. 6 (Petroläther)

Die Jodzahl der unverseifbaren Bestandteile ist im Mittel 92,2.

26,42 mg;	1,908 ml n/10-Bromlösung:	Jodzahl 91,7
30,26 mg;	2,211 ml n/10-Bromlösung:	Jodzahl 92,7

[24]) Z. angew. Chem. 1891, 565; Z. analyt. Chem., *31*, 477 (1892).
[25]) Z. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. *1*, 21 (1898).

Farbreaktionen auf Sterine

a) *Liebermann-Burchard*: Etwa 100 mg des Unverseifbaren werden in 2 ml Chloroform gelöst und 20 Tropfen Essigsäureanhydrid und 1 Tropfen konz. Schwefelsäure zugesetzt: blutrote Färbung, die in Purpurrot übergeht, während die Schwefelsäureschicht grüne Fluoreszenz zeigt.

b) *Hager-Salkowski*: Etwa 100 mg des Unverseifbaren werden in 2 ml Chloroform gelöst und mit dem gleichen Volumen konz. Schwefelsäure versetzt: grüne bis blaugrüne Färbung.

Sterinbestimmung nach *A. Schramme*[26])

Etwa 60 mg unverseifbare Bestandteile werden in 10 ml Alkohol (80%) unter Zusatz von etwas Chloroform gelöst. Dazu werden 10 ml heiße Digitoninlösung (0,05 g Digitonin in 10 ml Alkohol 80%) gegeben. Nach $^1/_2$stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad wird auf die Hälfte eingedampft und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wird wieder erwärmt, filtriert, der Niederschlag gut mit Äther, dann mit Azeton gewaschen und nach dem Durchstoßen des Fliters in ein Becherglas gespült. Auf dem Wasserbad wird er mit 20 ml Wasser ausgekocht und nach Zugabe von 20 ml Alkohol (96%) durch einen gewogenen Filtertiegel filtriert. Der Rückstand wird mit heißem Wasser, dann mit Azeton und Äther gewaschen. Die unverseifbaren Bestandteile enthalten im Mittel 16,67% mit Digitonin fällbare Sterine.

0,1257 g;	0,0825 g Digitonid:	16,56% Sterin
0,0365 g;	0,0240 g Digitonid:	16,57% Sterin
0,0605 g;	0,0404 g Digitonid:	16,87% Sterin

Herstellung des reinen Sterins

Zur Darstellung des reinen Sterins werden 54 mg des aus dem Digitoninanlagerungsprodukt hergestellten Sterinazetats in 3 ml 50%iger Kalilauge durch 2stündiges Erhitzen auf dem Wasserbad verseift. Man versetzt bis zur beginnenden Trübung mit Wasser und filtriert das sich dabei abscheidende Sterin ab. Es wird aus 96%igem Alkohol wiederholt umkristallisiert.

Sterin:		Schmp.: 136°	
$C_{24}H_{40}O$	(344,56)	Ber.: C 83,65%	H 11,70%
		Gef.: » 83,70%	» 11,81%

Herstellung des Sterinazetates

a) Zur weiteren Charakterisierung des Sterins wird das Azetat hergestellt: 240 mg Sterindigitonid werden mit 4 ml frisch destilliertem Essigsäureanhydrid in einem Reagenzglas mit aufgesetztem Steigrohr 15 Min. erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird in 16 ml 50%igen Alkohol gegossen, nach 1stündigem Stehen abfiltriert, mit 50%igem Alkohol ausgewaschen und dreimal aus Alkohol (50%) umkristallisiert. Schmp.: 121,2°.

b) Die Herstellung des Azetats wird außerdem auf kaltem Wege vorgenommen: 80 mg reines Sterin werden in 1 ml Pyridin gelöst und mit 0,7 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Das Reaktionsprodukt ist nach 2tägigem Stehen (20°) noch nicht einheitlich. Es wird daher erneut in 1 ml Pyridin gelöst und mit 0,5 ml Essigsäureanhydrid bei 50° 12 Stdn. lang stehengelassen. Ausbeute: 76,5 mg Azetat.

Sterinazetat:		Schmp.: 121,2°		
$C_{24}H_{39}OCOCH_3$	(386,596)			
		Ber.: C 80,77%	H 10,95%	$COCH_3$ 11,13%
		Gef.: » 80,79%	» 10,99%	» 10,99%

Die Azetylbestimmung ist nach *R. Kuhn* und *H. Roth*[27]) ausgeführt worden.

---

[26]) Fette u. Seifen *46*, 443 (1939).
[27]) Ber. dtsch. chem. Ges. *66*, 1274 (1933).

Herstellung des Sterinbenzoats

100 mg reines Sterin werden in 2 ml Pyridin gelöst und mit 5 Tropfen Benzoylchlorid 5 Std. lang auf Eis gestellt. Nach dieser Zeit in 10 ml 3%ige Sodalösung gegossen. Das Reaktionsprodukt wird 3mal aus Alkohol umkristallisiert. Ausbeute: 90 mg Sterinbenzoat.

Sterinbenzoat: Schmp. 142°
$C_{24}H_{39}OCOC_6H_5$ (448,662) Ber.: C 82,98% H 9,89%
Gef.: » 82,88% » 9,97%

Herstellung des Sterin-p-nitrobenzoats

60 mg reines Sterin werden in 10 ml Benzol und 2 ml Pyridin gelöst. Dann werden 100 mg p-Nitrobenzoylchlorid zugesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung wird ein Kristallisat erhalten.

Sterin-p-nitrobenzoat: Schmp.: 188°
Ber.: N 2,84% Gef.: N 2,80%
$C_{24}H_{39}OCOC_6H_4NO_2$ (493,662)

Absorptionsspektrum des Sterins

Das UV-Spektrum (Abb. 1) zeigt ein Maximum bei 275 mμ, c = 0,948 g/l in Methanol. Verwendet wird ein Unicam-Spektrophotometer SP 500.

Aufarbeitung der unverseifbaren Bestandteile durch Adsorption

5,9 g der unverseifbaren Bestandteile werden in petrolätherischer Lösung an eine Aluminiumoxydsäule (36 cm lang, 5 cm Durchmesser) adsorbiert. Mit Petroläther wird solange entwickelt, bis die Zonen sich scharf abgebildet haben. Folgende Zonen werden erhalten (Tab. 8):

Tabelle 8

Zone	Zonenlänge cm	Tageslicht	UV-Licht	Unverseifbare Bestandteile g
1. Zone	1,3	ocker	braun	0,3778
2. Zone	1,8	gelbbraun	gelbbraun	0,5148
3. Zone	2,1	gelbbraun	braungrau	0,7510
4. Zone	1,4	ocker	braun	0,3282
5. Zone	6,8	gelblich	gelblich	0,995
6. Zone	2,3	bräunlich	braungrau	0,4798
7. Zone	1,1	farblos	gelblich	0,2235
8. Zone	3,0	bräunlich	braungrau	0,543
9. Zone	1,0	bräunlich	grüngrau	0,123
10. Zone	6,2	bräunlich	bräunlich	0,015
11. Zone	8,0	gelblich	gelblich	0,013
Durchlauf				1,2850
				5,6491

Unter der Analysenquarzlampe wird die Säule in die einzelnsn Zonen zerlegt und anschließend jede für sich mit einer Mischung von 10 g Methanol und 90 g Äther extrahiert.

Zone 1, 2 und 3 bestehen im wesentlichen aus dem bei 136° schmelzenden Sterin. Das aus diesem hergestellte Acetat schmilzt ebenfalls bei 121,2°. Zonen 4, 5, 6 und 7 bestehen aus Cerylalkohol.

Cerylalkohol: Schmp.: 78° gef.: 78,5°
$C_{26}H_{53}OH$ (382,7) Ber.: C 81,59% H 14,22%
Gef.: » 81,90% » 14,41%

Das Azetat des Alkohols zeigt den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt von 65°.

Aus der 8. und 9. Zone kann keine einheitliche Substanz isoliert werden, Zonen 10 und 11 sind nahezu „leer".

Im Durchlauf ist wahrscheinlich n-Nonakosan vorhanden.

n-Nonakosan:	Schmp.: 64°	gef.: 64°
$C_{29}H_{60}$ (408,8)	Ber.: C 85,20%	H 14,80%
	Gef.: » 85,25%	» 14,73%

Glukosenachweis

In den weitgehend gereinigten spasmolytisch wirksamen Fraktionen des Azeton- und Essigesterauszuges kann auch nach der Hydrolyse nur Glukose papierchromatographisch nachgewiesen werden: Je 10 mml der zu prüfenden Lösung und, zum Vergleich, einer 1%igen Glukoselösung werden auf einen Papierstreifen *Schleicher & Schüll* 2043b aufgetragen. Unter Verwendung von Butanol-Eisessig-Wasser (5 : 1 : 4) werden gleiche R_F-Werte erhalten. Die Flecken werden mit Anilinphthalatlösung sichtbar gemacht.

Glukosebestimmung

3 ml der wirksamen Fraktion werden in einem größeren Reagenzglas mit 6 ml konz. Schwefelsäure unterschichtet und mit einem Thermometer in der Weise vermischt, daß die Temperatur nicht über 30° ansteigt. Nach 30 Min. werden 9 Tropfen einer 0,5%igen Lösung von Carbazol (Merck) in reinem Äthanol zugesetzt, der Ansatz in ein siedendes Wasserbad gesetzt, genau nach 2 Min. gut durchgeschüttelt und erneut 13 Min. lang erhitzt. Dann wird unter fließendem Wasser gekühlt und die Absorption gegen Wasser mit einem *Lange*-Colorimeter (Filter S 59) gemessen. Gleichzeitig werden die Extinktionen bekannter Glukoselösungen bestimmt. Die Meßdaten sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9

Versuchslösung	Angew. Menge bzw. Fraktion	Absorption %	Extinktion
Glukoselösung	7,60 mg	35,2	0,454
	12,24 „	38,9	0,410
	16,68 „	42,0	0,377
	19,47 „	44,8	0,350
Acetonextrakt	unverseifte Fraktion	41,7	0,380
	verseifte Fraktion	41,6	0,381
Essigester-Extrakt	unverseifte Fraktion	47,1	0,327
	verseifte Fraktion	47,2	0,326

Identifizierung der spasmolytisch wirkenden Substanz des Azetonauszuges

Die Komponente wird durch Ausschütteln aus saurem Medium des mit Kohle gereinigten Azetonauszuges gewonnen. Sie sublimiert bei etwa 140°, schmilzt bei 189—190°, ist dimorph und reagiert gegen Lackmus sauer.

Bernsteinsäure:	Schmp.: 185°	gef.: 189—190°
$C_4H_6O_4$ (118,09)	Ber.: C 40,68%	H 5,12%
	Gef.: » 40,77%	» 5,29%

Molekulargewichtsbestimmung nach Rast

Subst.: 6,33 mg; Kampfer: 80,48 mg; $\triangleleft = 25{,}7°$

Mol.-Gew.: 122,4

Alle Schmelzpunkte sind nach *Kofler* ausgeführt worden.

Der pharmakologische Test

Zur Ausführung des pharmakologischen Testes werden lebensfrisch entnommene Uterusteile von Ratten und Dünndarmstücke von Meerschweinchen nach der von *R. Magnus*[28]) zur Erforschung der glatten Muskulatur angeführten Versuchsanordnung in der von *W. Neumann* angegebenen und später von *W. Neumann* und *E. Habermann*[29]) verbesserten Apparatur mit den verschiedenen Fraktionen behandelt. Das Volumen der laufend mit Luft durchperlten und gleichbleibend auf 37° erwärmten Badflüssigkeit beträgt 20 ml. Die Bewegungsleistungen werden an einem Kymographen registriert. Die benutzten Meerschweinchen werden vorher 24 Stdn. lang nüchtern gehalten. 1,5—2 cm lange Darmstücke sind für den Einzelversuch ausreichend. Für die Austestung am Uterus werden Präparate von Ratten verwendet, die den Vorteil hoher Empfindlichkeit haben. Nach der Befestigung in der Apparatur werden die Muskelteile 30 Min. lang zur Anpassung an das veränderte Milieu hängen gelassen. Die Versuchslösungen werden vor dem Einbringen in die Muskelkammer auf die Temperatur des Tyrodebades erwärmt und sauer reagierende Fraktionen sowohl sauer als auch neutral getestet. Reaktionen können nur am gleichen Präparat und erst nach der dritten Spülung verglichen werden.

[28]) Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen, Tiere *102*, 123 (1904).
[29]) *E. Habermann*, Dissertation Würzburg 1951.

Druck: III-18-127. — KB DG 5000-80-53

Sonderdruck aus
„Archiv der Pharmazie“
289./61. Band, Heft 12, Seite 704—714
Verlag Chemie, G. m. b. H., Weinheim / Bergstraße

1542. Paul Tunmann*)

Über die Natur des Sterins aus Potentilla anserina

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg,
Direktor: Prof. Dr. *R. Dietzel*

(Eingegangen am 2. August 1956)

Bei der Aufarbeitung des Petrolätherextraktes läßt sich aus dem unverseifbaren Anteil mit Digitonin zu 16,7% ein Sterin abscheiden, das nach zehnmaligem Umkristallisieren aus 96%igem Äthanol (Blättchen) bei 136,5° C schmilzt und die spez.

*) Herrn Prof. Dr. *K. Winterfeld* zum 65. Geburtstag gewidmet.

Drehung $[\alpha]_D^{20} = -33{,}8°$ hat. Sein Acetat hat einen Schmelzpunkt von 121,2° C, der auch nach 20-maligem Umkristallisieren nur unwesentlich (123° C) erhöht werden kann. Der Schmelzpunkt des Benzoats liegt bei 142° C und der des p-Nitrobenzoats bei 188° C. Die Verbrennungswerte des reinen Sterins wie auch seiner Derivate passen auf die Formel $C_{24}H_{40}O$. Da das Sterin ein bemerkenswertes UV-Maximum bei 275 mμ aufweist, außerdem *Clotofski* und *Herr*[1]) ähnliche Analysenwerte und UV-Spektren für ein Sterin aus der Buchenrinde erhielten, erschien es notwendig, die Natur dieses Stoffes aufzuklären.

Die Reindarstellung der Sterine, besonders der Phytosterine, aus den Rohkristallisaten bereitet erhebliche Schwierigkeiten, da sie sich in ihren physikalischen Eigenschaften häufig nur wenig voneinander unterscheiden. In zahlreichen Fällen bilden die einzelnen Vertreter Molekülverbindungen oder Mischkristalle, was die Trennung der Komponenten erschwert. So haben sich viele, zuerst als einheitlich angenommene Sterine, später als Gemische erwiesen. Aus diesem Grund ist das Sterin aus Potentilla anserina vor seiner weiteren Untersuchung einer erneuten Reinigung unterworfen worden. *Bonstedt*[2]) hat eine solche beim Sitosterin durch wiederholtes Umkristallisieren des Sterins bzw. seines Acetats aus absolutem Äthanol erreicht. Dieses Verfahren ist zunächst auch hier angewandt worden. Das Sterin wurde 20mal aus absolutem Äthanol umkristallisiert, acetyliert und das Reaktionsprodukt in gleicher Weise 30mal gereinigt. Nach seiner Verseifung zeigte es einen Schmelzpunkt von 139—139,5° C. Dieses Verfahren ist jedoch sehr verlustreich. Eine bessere Ausbeute erhält man durch chromatographische Reinigung an Aluminiumoxyd nach *Brockmann*. Auch das derart erhaltene Sterin hat den Schmelzpunkt 139,5° C. Dieser liegt im gleichen Schmelzbereich wie der des β-Sitosterins (138—141° C), und der Mischschmelzpunkt mit diesem zeigt keine Depression. Man sollte daher annehmen, daß beide Stoffe identisch sind. Aber gerade in der Sterinchemie muß man in der Beurteilung von Mischschmelzpunkten sehr vorsichtig sein, da *Bonstedt*[3]) bei Dihydrocholesterin mit allo-α-Ergostanol und *Bengtsson*[4]) bei Fucostanol mit Stigmastanol, die nicht identisch sein können, keine Depression erhalten haben.

Die spez. Drehung $[\alpha]_D^{21} = -36°$ entspricht recht gut der des β-Sitosterins[5]) $[\alpha]_D = -36{,}1°$.

Trocknen des Sterins bei Zimmertemperatur im Hochvakuum ergibt einen Gewichtsverlust von 2,65%, entsprechend einem halben Mol Kristallwasser. Die Analysenwerte stimmen auf die Formel $C_{26}H_{46}O$. Bei der schweren Verbrennbarkeit der Sterine und ihrem großen Molekulargewicht könnte allerdings eine Schwankung der Formel um 1 CH_2-Gruppe nach unten oder oben möglich sein.

Das Acetat hat einen Schmelzpunkt von 123—125° C. Seine spez. Drehung beträgt $[\alpha]_D^{21} = -39{,}5°$ und liegt auch im Bereich der des β-Sitosterinacetats mit

[1]) Ber. dtsch. chem. Ges. *75*, 237 (1942).
[2]) *Hoppe-Seylers* Z. physiol. Chem. *176*, 269 (1928).
[3]) *Hoppe-Seylers* Z. physiol. Chem. *205*, 137 (1932).
[4]) *Hoppe-Seylers* Z. physiol. Chem. *237*, 46 (1935).
[5]) *B. E. Bengtsson, Hoppe-Seylers* Z. physiol. Chem. *215*, 179 (1933).

$[\alpha]_D = -39°$. Nur der Schmelzpunkt von 128° C des β-Sitosterinacetats, der durch wiederholtes Umkristallisieren des aus dem Handel bezogenen Sitosterins nach Acetylierung erhalten wird, ist bei dem Sterinacetat aus Potentilla anserina nie gefunden worden. Aus den Verbrennungswerten errechnet sich die Formel $C_{30}H_{50}O_2$. Danach besitzt das freie Sterin die Formel $C_{28}H_{48}O$.

Das UV-Spektrum des Sterinacetats zeigt nach seiner Reinigung nicht mehr lediglich ein Maximum bei 275 mμ, sondern ein breites Band mit 2 Maxima bei 273 mμ und 281 mμ, ein kleineres Maximum bei 295 mμ und eine Schulter bei 260 mμ. Es entspricht somit weitgehend dem des Ergosterins, das in reinstem Zustand Maxima bei 260, 269, 281 und 293 mμ aufweist. Abbildung 1 zeigt den Verlauf der Absorptionskurven der Acetate für jeweils eine 5%ige Lösung des gereinigten und ungereinigten Sterins. Zum Vergleich ist in derselben Konzentration das UV-Spektrum des Ergosterinacetats angegeben, das nach Acetylierung von aus dem Handel bezogenem Ergosterin erhalten und dreimal aus Äther umkristallisiert worden ist.

Wenn angenommen wird, daß das Sterin aus Potentilla anserina nach seiner Reinigung einheitlich ist, so zeigen die UV-Spektren, daß es eine dem Ergosterin sehr ähnliche Struktur besitzt. Allerdings muß der räumliche Aufbau der Molekel sich von diesem unterscheiden, da die Extinktionswerte verschieden sind. Für ein solches Verhalten sprechen z. B. die UV-Spektren von cis-trans-Isomeren, bei denen die cis-Formen in der Regel kleinere Extinktionswerte haben. Aber auch die zwei Doppelbindungen, die nach dem UV-Spektrum in Konjugation stehen und sich im Ring B des Sterinmoleküls befinden, können die Extinktionswerte beeinflussen. Diese sind bei Verbindungen mit Doppelbindungen in 5,7-Stellung größer als in 6,8-Stellung. Ob jedoch die hier angeführten Argumente so große Unterschiede in den Extinktionen hervorrufen können, kann zweifelhaft erscheinen.

Mit größerer Wahrscheinlichkeit ist anzunehmen, daß das gereinigte Sterin mit einem schwer abtrennbaren Begleiter verunreinigt ist, der entweder Ergosterin ist oder ergosterinähnliche Struktur besitzt.

Nehmen wir an, daß es sich um das Ergosterin selbst handelt, so läßt sich sein prozentualer Anteil im Sterin aus Potentilla anserina leicht aus den Extinktionswerten errechnen. Er beträgt 0,53%. Für diese geringe Menge spricht das Verhalten des Sterins gegenüber Maleinsäureanhydrid. So konnte bei der Ausführung der Dienzahlbestimmung praktisch kein Verbrauch an n/10-Kalilauge festgestellt werden.

Auch der Hydrierungsversuch mit einem Wasserstoffverbrauch, der dem einer Doppelbindung zukommt, zeigt, daß der Begleiter des Sterins, der auf Grund des UV-Spektrums mindestens zwei Doppelbindungen haben muß, nur in sehr geringer Menge vorhanden sein kann. Die Hydrierung ist in Eisessig unter Verwendung von Platinoxyd nach *R. Adams* vorgenommen worden. Der Verlauf der Wasserstoffaufnahme ist der Abbildung 2 zu entnehmen.

Das Hydrierungsprodukt, daß 3-mal aus Äther-Äthanol umkristallisiert wurde, zeigt einen Schmelzpunkt von 133 bis 134° C und eine spez. Drehung von

$[\alpha]_D^{23} = +10{,}5°$. Diese Werte stimmen einigermaßen mit den in der Literatur für β-Sitostanolacetat angegebenen überein (Schmp. 128—138° C; $[\alpha]_D = +11°$ bis $+13°$)[6].

Das Bromaddukt, das bei der Einwirkung einer Brom-Eisessiglösung (5%) auf das in Äther gelöste Sterinacetat bei 0° erhalten wird, hat nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Chloroform-Methanol einen Schmelzpunkt von 116—124°. Da es nicht kristallin war, wurde seine Reinigung an Aluminiumoxyd nach *Brockmann* versucht, und es gelang hierbei, ein Bromderivat zu erhalten, das sehr schön in Blättchen kristallisierte und nunmehr einen Schmelzpunkt von 119—121° aufwies. Dieser stimmt mit dem der Literatur entnommenen für β-Sitosterinacetatdibromid überein. Das gleiche gilt für die CH- und Br-Werte.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Sterin aus Potentilla anserina ein Gemisch ist. Der Hauptanteil ist ein Sterin, das nur eine Doppelbindung im Ringsystem enthält. Dafür spricht auch die spez. Drehung mit $[\alpha]_D = -36°$, die in dem Bereich liegt, der für solche Sterine charakteristisch ist. Dieser Hauptbestandteil ist β-Sitosterin, was aus den Schmelzpunkten, den spez. Drehwerten und den Analysenzahlen des Hydrierungsproduktes und Bromadduktes hervorgeht.

Zur weiteren Aufklärung der Natur des Begleiters des Sterins sind die Farbreaktionen genauer geprüft worden. Die Reaktion nach *Liebermann-Burchardt* zeigt keine Besonderheiten.

Nach einer anfangs violetten Färbung geht diese in Blaugrün und schließlich in Smaragdgrün über. Sie wird von fast allen Sterinen in der gleichen Form gegeben. Spezifischer ist jedoch die Farbreaktion nach *Salkowski*. Während nämlich beim Sitosterin die obere Chloroformschicht sich rot anfärbt, die untere Schwefelsäureschicht aber farblos bleibt, kann bei der Prüfung mit unserem Sterin beobachtet werden, daß sowohl die obere als auch die untere Schicht rot gefärbt ist. Dabei richtet sich die Intensität der Färbung der unteren Zone nach der angewandten Sterinmenge. Diese Feststellung hat Bedeutung, da sie bisher nur beim Ergosterin beobachtet wurde. Der Ausfall der Farbreaktion ist daher so zu erklären, daß die Färbung der oberen Schicht dem β-Sitosterin zuzuschreiben ist, während die der unteren vom Ergosterin oder einem dem Ergosterin ähnlich gebauten Sterin herrührt. Eine weitere für Ergosterin, seine Ester und verschiedene Umwandlungsprodukte sehr spezifische Farbreaktion ist die Probe nach *Tortelli* und *Jaffé*[7]. In der modifizierten Ausführung von *Häussler* und *Brauchtli* geben $^1/_2$ mg Ergosterin eine undeutliche, 1 mg eine schöne Grünfärbung. Es zeigt sich, daß bei Anwendung von 1—2 mg des Sterins aus Potentilla anserina keine Färbung auftritt. Werden aber 200 mg verwendet, in denen nach der Berechnung etwa 1 mg, sofern der Begleiter Ergosterin ist, vorhanden ist, so tritt eine Grünfärbung auf, die derjenigen entspricht, die mit 1 mg Ergosterin erhalten wird.

[6]) *J. Heilbron, E. Jones, K. Roberts* und *P. Wilkonson*, J. chem. Soc. London, 1941, 344.
[7]) Chem. Ztg. *39*, 14 (1915); *Häussler*, Helv. chim. Acta *12*, 187 (1929); *Heilbron*, Biochem. J. *24*, 133 (1930); *Petrow, Rosenheim* und *Starling*, Soc. 1938, 677; *Westphal*, Ber. dtsch. chem. Ges. *72*, 1243 (1939).

Wenn aber auch diese Reaktionen für Ergosterin und seine Derivate sehr spezifisch sind, so lassen sie doch nicht den Schluß zu, daß der Begleiter Ergosterin ist, zumal durchaus die Möglichkeit besteht, daß auch das 7-Dehydro-β-Sitosterin, das entsprechende γ-Sitosterin oder das 7-Dehydrostigmasterin die gleichen Farbreaktionen liefern, Verbindungen allerdings, die in der Natur noch nicht gefunden worden sind. Eine diesbezügliche Klärung ist von wesentlicher Bedeutung, da in der Literatur wiederholt die Ansicht vertreten wird, daß Ergosterin, ein Pilzsterin, sich auch in tierischen Organen und höheren Pflanzen finden soll. Diese Angaben stützen sich auf spektrographische Untersuchungen oder auf die antirachitische Aktivierbarkeit der Substanzen.

Von unserem Sterin sind nur etwa 1,5 g, von dem Begleiter somit 7,5 mg, berechnet als Ergosterin, erhalten worden. Mit Rücksicht auf diese geringe Menge ist papierchromatographisch versucht worden, Klarheit über die Natur des begleitenden Sterins zu erhalten.

Die Papierchromatographie der Phytosterine ist bisher wenig bekannt. Wohl gibt es eine Anzahl von Arbeiten über die Papierchromatographie der Steroide[8]), aber meist sind die angewandten Lösungsmittelgemische unbrauchbar, da die Sterine am Startpunkt zurückbleiben und somit das oft verwendete Formamid als stationäre Phase ungeeignet ist. Auch Heptanol, das *Hoffmann* und *Staudinger* (l. c.) verwenden, führt nicht zum Erfolg. So bereitet die Papierchromatographie der Sterine große Schwierigkeiten, die besonders auch von *M. McMahon* und Mitarbeitern (l. c.) bestätigt werden. Sie untersuchten über 100 Lösungsmittelgemische, bis es ihnen gelang, Ergosterin von Cholesterin zu trennen. Verwendet wurde dazu ein Gemisch aus 14 Teilen Phenol, 30 Teilen Methanol und 56 Teilen Wasser.

Auf der Suche nach einem geeigneten Lösungsmittelgemisch der Papierchromatographie der Phytosterine sind Hunderte geprüft und die verschiedensten Verfahren berücksichtigt worden.

Arbeitet man auf unbehandeltem Papier, so kann das Lösungsmittelgemisch Butanol-Methanol-Benzin-Wasser im Volumenverhältnis 1 : 2 : 1 : 1 verwendet werden. Das Gemisch ist zweiphasig. Mit der unteren Phase wird das Papier gesättigt, die obere dient zur Entwicklung. Die R_f-Werte liegen für β-Sitosterinacetat bei 0,81, für Ergosterinacetat bei 0,91 und können durch Veränderung des Gemisches nicht wesentlich verbessert werden.

Ähnlich, hinsichtlich der R_f-Werte noch ungünstiger, liegen die Verhältnisse bei Verwendung des Gemisches Butanol 60 Volumenteile, Methanol 25 Volumenteile

[8]) *A. Zaffaroni, R. B. Burton* und *E. H. Kentman*, J. biol. Chemistry *177*, 109 (1949); *J. M. McMahon, R. B. Davis* u. *G. Kalnitzky*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *75*, 799 (1950); *E. Bush*, Nature (London), *166*, 445, 9/9 (1950); Biochem. J. *50*, 370 (1952); *R. B. Burton, A. Zaffaroni* u. *E. H. Kentman*, J. biol. Chemistry *188*, 763 (1951); *Hoffmann* u. *Hj. Staudinger*, Naturwissenschaften *38*, 213 (1951); Biochem. Z. *322*, 230 (1951); *Harrison, E. G.*, Analyt. Chem. *24*, 208 (1952); *H. J. Hübner, E. Hoffmann* u. *F. Bode, Hoppe-Seylers* Z. physiol. Chem. *289*, 102 (1952); *D. Kritschewsky* u. *M. R. Kirk*, Arch. Biochem. Biophysics *35*, 346 (1952); *Neher* u. *Wettstein*, Helv. chim. Acta *35*, 276 (1952); *Y. Sjövall*, Acta chem. scand. *6*, 1552 (1952); *A. V. Schwarz*, Biochem. J. *53*, 148 (1953); *S. Arogave* u. *L. R. Axelrod*, J. biol. Chemistry *208*, 579 (1954).

und Wasser 15 Volumenteile. Dieses Lösungsmittel ist einphasig und ergibt für β-Sitosterinacetat den R_f-Wert von 0,82 und für Ergosterinacetat den von 0,77.

Ausschlaggebend für eine erfolgreiche papierchromatographische Untersuchung von Phytosterinen sind Arbeiten von *Winteringham*[9]), *H. P. Kaufmann*[10]) und Mitarbeitern gewesen, die höher siedende Kohlenwasserstoffe als stationäre Phase verwenden.

Zur Untersuchung des Sterins aus Potentilla anserina ist Paraffinöl als stationäre Phase und zur Entwicklung Methanol, Äthanol, Ameisensäure, Essigsäure oder Acetanhydrid verwendet worden. Mit dieser Methode werden nach dem aufsteigenden und absteigenden Verfahren sehr schöne Verteilungen auf dem Papier erhalten. Selbst die C_{24}-Epimeren des Sitosterins lassen sich trennen.

Die Untersuchung des Sterins zeigt nun, daß der Hauptanteil identisch ist mit dem β-Sitosterin. Das tritt besonders deutlich hervor (siehe Abb. 3), wenn nur wenig des Sterins aufgetragen wird. Erhöht man aber die Sterinmenge auf dem Papier, so beobachtet man deutlich 4 Flecken, von denen keiner den gleichen R_f-Wert wie das Ergosterin hat. Damit ist erwiesen, daß das begleitende Sterin kein Ergosterin ist. Dieses Ergebnis ist außerdem durch die papierchromatographische Untersuchung der nach Verseifung aus dem Sterinaddukt mit Maleinsäureanhydrid erhaltenen Dicarbonsäure erhärtet worden. So zeigt die „Ergosterin-Maleinsäure" in Butanol-Wasser 1 : 1 den R_f-Wert 0,96, während der der Säure aus dem Sterin von Potentilla anserina bei 0,92 liegt. Auch das Acetylderivat des Sterinmaleinsäureanhydrids zeigt gegenüber dem des Ergosterinmaleinsäureanhydrids auf mit Paraffinöl imprägnierten Papier einen anderen R_f-Wert, wenn mit Ameisensäure entwickelt wird. Die Flecken sind im UV zu erkennen.

Während die Flecken a und b (siehe Abb. 3) dem β- und γ-Sitosterinacetat zukommen, kann noch nichts über das Sterin ausgesagt werden, das den Fleck c hervorruft. Der Fleck d jedoch stellt das Sterin dar, das das charakteristische UV-Spektrum gibt.

Im Augenblick lassen sich noch keine sicheren Aussagen über die chemische Konstitution des Sterins mit dem charakteristischen UV-Spektrum machen. Da Stigmasterin, wie aus dem Reaktionsablauf zur Darstellung des Bromadduktes hervorgeht, nicht vorhanden ist, kann vermutet werden, daß letzteres einem der C_{24}-Epimeren des 7-Dehydrositosterins zukommt. Es ist aber auch denkbar, daß es mit diesem nichts zu tun hat. Die Arbeiten werden fortgesetzt.

Beschreibung der Versuche

Reinigung des Sterins aus Potentilla anserina

a) Etwa 3 g rohes Sterin werden 20mal aus absolutem Äthanol umkristallisiert, wobei jeweils nur die zuerst anfallenden Kristallisate verwendet werden. 1,5 g dieses Sterins werden in 40 ml frisch destilliertem, trockenem Pyridin gelöst und mit 40 ml Acetanhydrid zunächst 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur und anschließend 48 Stunden bei 40° acetyliert. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird das Reaktionsprodukt in 800 ml dest. Wasser gegossen. Das dabei ausfallende Acetat wird nach 3 Stunden ab-

[9]) *F. Winteringham, A. Harrison, R. Bridge*, Nature (London) *166*, 999 (1950).
[10]) *H. P. Kaufmann* u. *W. H. Nitsch*, Fette, Seifen, Anstrichmittel *56*, 154 (1954).

gesaugt und schließlich 30mal aus absolutem Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 430 mg Sterinacetat. Dann wird das Acetat durch einstündiges Erhitzen auf dem Wasserbad mit 25 ml 5%iger alkoholischer Kalilauge verseift. Das Sterin wird mit Wasser ausgefällt und 3mal aus absolutem Äthanol umkristallisiert: 400 mg Sterin. Schmp. 139—139,5° C. Zur Bestimmung der spez. Drehung wird die Substanz 8 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet: $[\alpha]_D^{21} = -35{,}99° \pm 0{,}3°$ (c = 3,223 in Chloroform). 64,46 mg Substanz zu 2 ml; l = 1 dm; $\alpha_D^{21} = -1{,}16° \pm 0{,}01°$.

Trocknung zur Analyse gibt bei Zimmertemperatur im Hochvakuum 2,65% Gewichtsverlust, entsprechend $^1/_2$ Mol Kristallwasser.

$C_{26}H_{46}O$ (Mol.-Gew. 374,6) Ber.: C 83,35% H 12,38%
Gef.: » 83,45% » 12,25%

b) 22 g der unverseifbaren Anteile des Petrolätherextraktes werden in Petroläther gelöst und an 660 g mit Petroläther vorgefeuchtetes Aluminiumoxyd (stand. nach *Brockmann*) chromatographiert. Es wird solange mit Petroläther entwickelt, bis sich die Zonen gut ausgebildet haben und der Durchlauf keinen Rückstand mehr hinterläßt. Dann wird mit Benzol eluiert. Von den nunmehr anfallenden Fraktionen werden die vereinigt, die sich nach dem Abdunsten des Lösungsmittels im Vakuum aufziehen lassen.

Ausbeute: 4,9 g Rohsterin. Dieses wird erneut an 150 g Aluminiumoxyd (*Brockmann*) chromatographiert und die Fraktionen vereinigt, aus denen Kristallisate mit dem Schmelzpunkt 138—141° C erhalten werden. Diese werden anschließend 3mal aus absolutem Äthanol, 3mal aus Essigester, 3mal aus Petroläther und noch einmal aus absolutem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,5 g reines Sterin. Schmp. 139,5° C. Die optische Drehung entspricht der des unter a dargestellten Sterins. Das gleiche gilt für das UV-Spektrum. Der Mischschmelzpunkt mit β-Sitosterin zeigt keine Depression. Das Sterin ist mit Digitonin fällbar.

Farbreaktionen:

a) *Liebermann — Burchardt*

Etwa 0,5 mg Sterin werden in 1 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und dazu eine kalte Lösung von 2 Tropfen konz. Schwefelsäure in 0,5 ml Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Es tritt eine rotviolette Färbung ein, die sich rasch in Karmin verwandelt und dann über Blau in Grün übergeht.

b) *Salkowski*

Wenig Sterin wird in Chloroform gelöst und mit dem gleichen Volumen konz. Schwefelsäure versetzt:

Sterin	Färbung der unteren Schicht	Färbung der oberen Schicht
β-Sitosterin	farblos	rot
Ergosterin	rot	farblos
Sterin aus Potentilla ans.	rot	rot

c) *Tortelli* und *Jaffé* (mod. von *Häußler* und *Brauchtli*)

5 ml reines Olivenöl werden mit einer Auflösung des Sterins in 10 ml Chloroform und 1 ml Eisessig gemischt. Fügt man hierzu 2,5 ml einer Lösung von 10% Brom in Chloroform und schüttelt durch, so tritt mit 1 mg Ergosterin eine deutliche Grünfärbung auf:

1 mg Ergosterin	grüne Färbung;
2 mg β-Sitosterin	negativ;
2 mg Sterin aus Potentilla anserina	negativ;
200 mg Sterin aus Potentilla anserina	grüne Färbung (Intensität entspricht der Färbung von 1 mg Ergosterin).

Herstellung des Sterinacetats

250 mg des Sterins werden in 5 ml frisch destilliertem, trockenem Pyridin gelöst und mit 5 ml Acetanhydrid versetzt. Das gut verschlossene Gefäß wird 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur und die gleiche Zeit anschließend bei 40° stehen gelassen. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird das Reaktionsprodukt in 100 ml destilliertes Wasser gegossen. Nach einer Stunde wird der Niederschlag abgesaugt und wiederholt aus absolutem Äthanol umkristallisiert. Das Acetat kristallisiert zunächst in Körnern aus, die über Nacht in Nadeln übergehen.

Ausbeute nach dreimaligem Umkristallisieren: 200 mg Acetat.

Schmp. 123—125° C.

Zur Bestimmung der optischen Drehung wird die Substanz bei 80° getrocknet. $[\alpha]_D^{21} = -39{,}48° \pm 0{,}7°$ (c = 0,9625 in Chloroform).

19,25 mg Subst. zu 2 ml; l = 1 dm; $\alpha_D^{21} = -0{,}38° \pm 0{,}01°$.

Bei der Trocknung des Acetats zur Analyse im Hochvakuum bei 50° C tritt ein Gewichtsverlust von 0,66% ein.

$C_{30}H_{50}O_2$ (442,7) Ber.: C 81,38% H 11,38%
Gef.: » 81,45% » 11,41%

Hydrierung des Sterinacetats

Zur Hydrierung wird ein gegen Wasser abgeschlossenes System verwendet. In einer Schüttelbirne werden 30 mg Platinoxyd nach *R. Adams* in 5 ml Essigsäure mit Wasserstoff bis zur Sättigung geschüttelt. Dann wird die Lösung von 98,4 mg Sterinacetat in 50 ml Essigsäure zugesetzt und der Verlauf der Wasserstoffaufnahme alle 15 Minuten beobachtet (siehe Abb. 2).

98,4 mg Sterinacetat Ber.: H_2 4,98 ml Gef.: H_2 4,9 ml

Bei einem Vorversuch mit 100,6 mg Sterinacetat in 25 ml Essigsäure zeigte sich, daß während der Hydrierung Abscheidungen auftraten. Diese wurden nach beendeter Wasserstoffaufnahme in weiteren 25 ml Essigsäure gelöst. Die erneute Hydrierung ergab keinen Verbrauch an Wasserstoff.

100,6 mg Sterinacetat Ber.: H_2 5,09 ml Gef.: H_2 5,2 ml

Die erhaltenen Hydrierungsprodukte zeigen noch eine schwache Farbreaktion mit *Carr-Price*-Reagens. Sie sind daher erneut 24 Stunden lang in Essigsäure hydriert worden. Erst nach dieser Zeit ist der Farbtest negativ.

Das Reaktionsprodukt wird aus Äther-Äthanol dreimal umkristallisiert und hat den Schmelzpunkt 133—134° C.

Die spez. Drehung beträgt $[\alpha]_D^{23} = +10{,}46° \pm 0{,}3°$ (c = 2,7925 in Chloroform).

55,85 mg Subst. zu 2 ml; l = 1 dm; $\alpha_D^{23} = +0{,}29° \pm 0{,}01°$.

$C_{31}H_{54}O_2$ (458,7) Ber.: C 81,16% H 11,87%
Gef.: » 81,50% » 11,52%

Bromierung des Sterinacetats

600 mg Sterinacetat werden in 7 ml absolutem Äther gelöst und unter Rühren bei 0° mit 7,5 ml einer Brom-Eisessiglösung (5 g Brom in 100 ml Eisessig) tropfenweise versetzt. Dabei treten Abscheidungen auf. Man läßt 5 Stunden lang im Eisschrank stehen und destilliert anschließend zur Trockne. Der Rückstand wird aus Chloroform-Äthanol umkristallisiert. Schmp. 116—124° C. Wiederholtes Umkristallisieren zeigt keine Erhöhung des Schmelzpunktes.

Chromatographische Reinigung des Bromadduktes

Das oben erhaltene Reaktionsprodukt wird in Benzin (55°—70° C) gelöst und an 15 g mit Benzin vorgefeuchtetes Aluminiumoxyd (*Brockmann*) chromatographiert. Aus dem Durchlauf kristallisieren Blättchen aus; Schmp. 119—121° C.

Zur Analyse wird die Substanz 8 Stunden lang bei Zimmertemperatur im Vakuum getrocknet.

$C_{31}H_{52}O_2Br_2$ (Mol.-Gew. 616,6)	Ber.: C 60,38%	H 8,50%	Br 25,92%
	Gef.: » 60,54%	» 8,39%	» 26,15%

Bestimmung der Dienzahl

69,716 mg Sterinacetat werden in ein Reagensglas mit 10 ml einer Lösung von Maleinsäureanhydrid in Aceton (10 g/L) gebracht. Nach dem Zuschmelzen des Glases wird dieses 24 Stunden lang in einem Heizbad auf 100° erhitzt. Sodann wird geöffnet und der Inhalt mit 100 ml kohlendioxydfreiem Wasser in einen Erlenmeyerkolben gespült. Nach dem Filtrieren wird mit n/10 Kalilauge (Phenolphthalein) titriert. Verbrauch: 0,0 ml n/10 Kalilauge. Somit ist die Dienzahl gleich 0.

Darstellung der „Sterin-Maleinsäure" zur Papierchromatographie

700 mg Sterinacetat werden in ein Bombenrohr mit 380 mg Maleinsäurehydrid und 2 ml Xylol gebracht und nach dem Verschließen etwa 12 Stunden lang in einem Heizbad auf 135° C erhitzt. Nach dem Öffnen des Rohres wird das Lösungsmittel im Vakuum abgesaugt. Der Rückstand wird mit einer Lösung von 0,5 g Kaliumhydroxyd in 6 ml Methanol $2^1/_2$ Stunden lang verseift. Nach dem Verdünnen mit der gleichen Menge Wasser schüttelt man das nicht umgesetzte Sterin mit Petroläther aus. Die wäßrig-alkalische Phase, die die „Sterin-Maleinsäure" enthält, wird angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherphase wird mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen mit frisch geglühtem Natriumsulfat zur Papierchromatographie verwendet.

Darstellung des Acetylderivates des Sterin-Maleinsäureanhydrids

Die ätherische Lösung der „Sterin-Maleinsäure" wird vom Äther befreit und der Rückstand mit etwa 1 ml Essigsäureanhydrid 3 Stunden lang auf dem Wasserbad zum Maleinsäureanhydridaddukt des Sterinacetats umgesetzt. Dann wird im Vakuum zur Trockne gesaugt und der Rückstand papierchromatographisch untersucht.

Zum Vergleich sind die entsprechenden Ergosterinderivate in der gleichen Weise dargestellt worden.

Papierchromatographie

Sterinacetate

1. Die Papierchromatographie mit den Lösungsmittelgemischen Butanol-Methanol-Benzin-Wasser im Volumenverhältnis 1 : 2 : 1 : 1 und Butanol-Methanol-Wasser 24 : 10 : 6 (v/v) wird mit dem langsam laufenden Papier *Schleicher u. Schüll* 2045b gl und nach aufsteigenden Verfahren durchgeführt. Als Gefäß dient ein Behälter mit den Ausmaßen 40 × 25 × 10 cm. In diesem wird das Papier zunächst 24 Stunden lang entweder mit der unteren Schicht des zweiphasigen oder mit dem einphasigen Lösungsmittelgemisch sich selbst überlassen. Nach der Entwicklung, die etwa 16 Stunden dauert, werden die Streifen bei 90° C getrocknet und anschließend mit einer Lösung von 10 g Trichloressigsäure, 0,2 g Chloramin in 30 g Wasser besprüht. Nun werden sie 5 Minuten lang auf 120° C erhitzt und dann unter Analysenquarzlampe ausgewertet. Die Trennungen sind nicht sehr scharf.

2. Die Streifen werden mit einer Lösung aus Paraffinöl in Benzin im Volumenverhältnis 1 : 10 getränkt, dann zwischen Filtrierpapier abgepreßt und schließlich getrocknet. Nach dem Aufsetzen der Substanzen, die zweckmäßig in Äther-Paraffinöl (1 + 1) gelöst

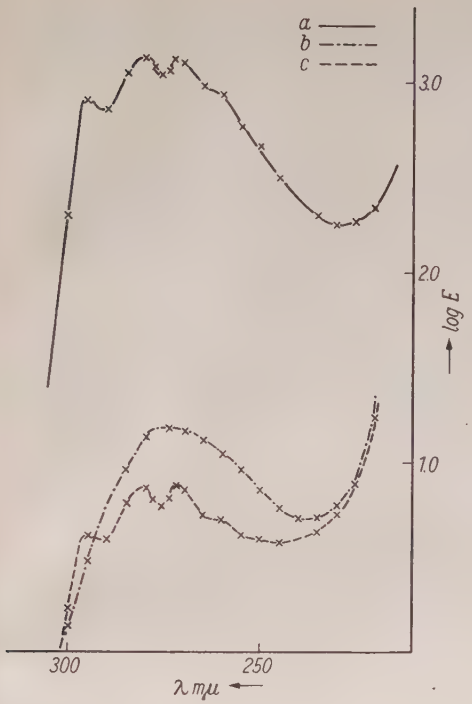


Abb. 1. UV-Absorptionsspektren vom
a) Ergosterinacetat
b) ungereinigten Sterin aus Potentilla anserina
c) gereinigten Sterin aus Potentilla anserina (c = 5% in Äthanol).

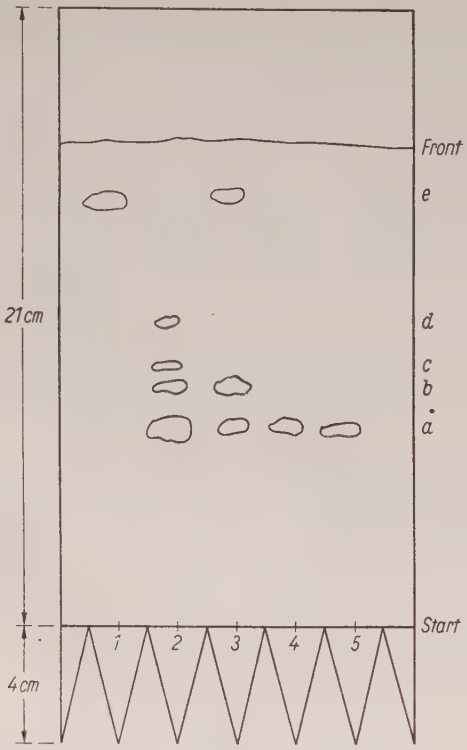
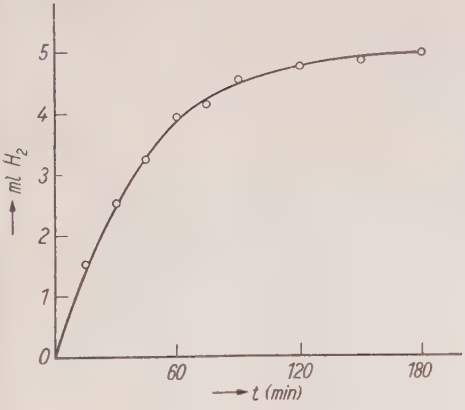


Abb. 3. Schematische Darstellung einer papierchromatographischen Analyse der Acetate von
1. Ergosterin
2. 1,0 mg Sterin aus Potentilla anserina
3. Ergosterin, β- und γ-Sitosterin
4. wenig Sterin aus Potentilla anserina
5. β-Sitosterin



← Abb. 2. Verlauf der Wasserstoffaufnahme beim Sterinacetat aus Potentilla anserina (98,4 mg)

sind, werden die Streifen sofort mit den Lösungsmitteln Äthanol oder Essigsäure, die zuvor mit Paraffinöl gesättigt worden sind, entwickelt. Laufzeit: 48 Stunden im aufsteigenden Verfahren. Nach dem Trocknen der Streifen werden diese, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

Dicarbonsäure

Die Papierchromatographie der nach dem Verseifen aus dem Additionsprodukt des Sterinacetats mit Maleinsäureanhydrid entstehenden Säure erfolgt auf dem Papier *Schleicher u. Schüll* 2043b mgl. Als Lösungsmittel dient Butanol-Wasser (1 : 1). Nach 24stündiger Sättigung des Papiers mit der unteren Phase wird mit der oberen entwickelt. Die Flecken sind im UV sofort sichtbar.

Acetylderivat des Sterinmaleinsäureanhydrids

Zur Papierchromatographie dieser Verbindung wird das Papier *Schleicher u. Schüll* 2043b mgl zunächst mit einer Lösung von Paraffinöl in Benzin (1 : 10) imprägniert (siehe oben). Zur Entwicklung wird mit Paraffinöl gesättigte Ameisensäure verwendet. Die Flecken sind im UV sichtbar.

Anschrift: Dr. *Paul Tunmann*, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg.

DG 5000/245/55-III-18-127

Sonderdruck aus
„Archiv der Pharmazie“
289./61. Band, Heft 7, Seite 329—338
Verlag Chemie G. m. b. H., Weinheim/Bergstraße

1505. Paul Tunmann*)

Qualitative und quantitative Papierchromatographie aliphatischer Aldehyde und Ketone

Aus dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, Direktor: Prof. Dr. *R. Dietzel*

(Eingegangen am 15. Februar 1956)

Beim oxydativen Abbau von Sterinen entstehen in geringen Mengen Ketone, die für die Konstitutionsaufklärung der Seitenkette wichtig sind. So haben aus 30 g Acetylcholesterin *Windaus* und *Resau*[1]) 200 mg, *Bengtsson*[2]) 150 mg und *Dirscherl* und *Nahm*[3]) 70 mg rohes Semikarbazon des Methylisohexylketons erhalten. Da für die Untersuchung des aus Potentilla anserina isolierten Sterins jedoch nur etwa 2 g zur Verfügung standen, wird in vorliegender Arbeit versucht, die sich bildenden aliphatischen Ketone als 2,4-Dinitrophenylhydrazone abzuscheiden und als solche papierchromatographisch zu identifizieren. In diesem Zusammenhang wird die Papierchromatographie aliphatischer Aldehyde und Ketone studiert.

Die Papierchromatographie von Aldehyden und Ketonen ist bisher nur wenig untersucht worden. *J. V. Kostir* und Mitarbeiter[4]) verwenden azetyliertes Papier oder acetyliertes Papier, das zuvor mit einer Mischung aus Methanol und Octanol (5 + 95) imprägniert wird. Als mobile Phase dient Petroläther-Benzol (1 + 1) oder Methanol-Heptan. Auch *N. B. Neiman* und Mitarbeiter[5]) arbeiten mit acetyliertem Papier und erhalten gute Trennungen, besonders bei erhöhter Temperatur (20°—40°) mit 96%igem Aethanol als beweglicher Phase. *Rice* und Mitarbeiter[6]) schlagen mit Kieselsäure getränktes Papier und als Lösungsmittel Äther-Petroläther vor. Schließlich beschreiben *C. D. Douglas* und Mitarbeiter[7]) die Papierchromatographie der Flavanone auf unbehandeltem Papier mit Wasser-Dioxan-Eisessig im Volumenverhältnis 5 : 3 : 2, und *D. F. Meigh*[8]) trennt die

*) Herrn Prof. Dr. *R. Dietzel* zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1]) Ber. dtsch. chem. Ges. *46*, 1247 (1913).

[2]) *Hoppe-Seylers* Z. physiol. Chem. *215*, 179 (1933).

[3]) Liebigs Ann. Chem. *555*, 57 (1944).

[4]) *J. V. Kostir* und *K. Slavik*, Chem. Listy Vědu Prumysl *44*, 17 (1950); Collect. Trav. chim. Tchécoslov. *15*, 17 (1950).

[5]) *N. B. Neiman*, *W. N. Lewkowskin* und *A. F. Lukownikow*, Ber. Akad. Wiss. UdSSR (N. S.) *81*, 841 (1951).

[6]) *C. Rice*, *G. J. Keller* und *J. G. Kirchner*, Anal. Chem. *23*, 194 (1951).

[7]) *C. D. Douglas*, *Quentin L. Morris* und *S. H. Wender*, J. Amer. chem. Soc. *73*, 4023 (1951).

[8]) Nature *170*, 579 (1952).

Aldehyde von Ketonen, die Carboxylgruppen enthalten, mit einem Alkohol-Wassergemisch als Lösungsmittel. In allen diesen Fällen werden die Carbonylverbindungen als 2,4-Dinitrophenylhydrazone aufgetragen.

Nur *H. Grohmann* und *F. H. Mühlberger*[9]), die eine Methode zum papierchromatographischen Nachweis von Zimtaldehyd neben anderen Aromastoffen beschreiben, tragen die zu untersuchende Substanz als solche auf und verwenden Benzin, wodurch Verluste durch Oxydation auf dem Papier vermieden werden. Die Flecken werden mit Hydrazin bzw. Benzidin sichtbar gemacht.

Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß die Papierchromatographie der Aldehyde und Ketone als 2,4-Dinitrophenylhydrazone Schwierigkeiten bereitet, da in der Regel nur mit vorbehandeltem Papier eine Trennung erreicht wird. Wenn sie auf den üblichen Papieren nicht gelingt, so liegt das, wie in vielen Vorversuchen gezeigt werden konnte, an den gebräuchlichen 2-Phasensystemen, in denen eine Verteilung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone nicht zustande kommt.

Auch in vorliegender Arbeit wird versucht, die Carbonylverbindungen als 2,4-Dinitrophenylhydrazone papierchromatographisch zu trennen, zumal diese Stoffe leicht erhalten werden können und es sich erübrigt, die Flecken durch ein besonderes Reagens sichtbar zu machen. Noch geringste Mengen (etwa 0,5 γ 2,4-Dinitrophenylhydrazon) lassen sich auf dem Papier gut erkennen. Die Flecken erscheinen im UV-Licht und nach dem Besprühen mit 10%iger Natronlauge bei Tageslicht braun.

Von den etwa 70 untersuchten Lösungsmitteln konnten folgende 4 Gemische in die engere Wahl gezogen werden:

A: Cyclohexan-Methanol-Essigsäure-Wasser 6 : 12 : 1 : 2 (Volumenverhältnis)

B: Cyclohexan-Äthanol-Essigsäure-Wasser 6 : 12 : 1 : 2 (Volumenverhältnis)

C: Cyclohexan-Propanol-Essigsäure-Wasser 6 : 12 : 1 : 2 (Volumenverhältnis)

D: Benzin(55—70°)-Methanol-Essisäure-Wasser 3 : 6 : 1 : 1 (Volumenverhältnis)

Von diesen sind die Mischungen A, B und D 2-Phasensysteme, Lösungsmittel C ist einphasig. Gemische A, B und C unterscheiden sich nur durch die Alkoholkomponente und zeigen gute Trenneffekte. Das gilt besonders für die Methanol- und Äthanolmischung, während im Lösungsmittelgemisch C die 2,4-Dinitrophenylhydrazone schon besser löslich sind, so daß die R_f-Werte größer werden und eine scharfe Trennung schwerer zustande kommt. So übt die Alkoholkomponente einen wesentlichen Einfluß auf die Größe der R_f-Werte aus (s. Tab. 1).

Lösungsmittelgemisch D enthält an Stelle des Cyclohexans Benzin (55—70°), in dem offenbar die Löslichkeiten der 2-4-Dinitrophenylhydrazone differenzierter sind. Das Gemisch enthält außerdem mehr Essigsäure. Die R_f-Werte liegen zwischen denen, die mit den Gemischen A und C erhalten werden. Die Flecken sind sehr diskret.

---

[9]) Z. Lebensmittel-Unters. u. -Forsch. *99*, 361 (1954).

Tabelle 1

Abhängigkeit der R_f-Werte von der Wahl der Lösungsmittelgemische

2,4-Dinitrophenylhydrazon vom	R_f-Werte Lösungsmittelgemisch A	B	C	D
Formaldehyd	0,29	0,42	0,51	0,30
Acetaldehyd	0,45	0,55	0,64	0,47
Propionaldehyd	0,60	0,66	0,75	0,65
n-Butyraldehyd	0,70	0,73	0,81	0,75
Isobutyraldehyd	0,71	0,75	0,83	0,77
Isovaleraldehyd	0,76	0,78	0,85	0,82
n-Önanthaldehyd	0,83	0,82	0,87	0,88
Crotonaldehyd	0,58	0,64	0,72	0,60
Aceton	0,58	0,66	0,74	0,65
Diäthylketon	0,75	0,79	0,84	0,84
Diisopropylketon	0,81	0,83	0,88	0,88
Methyläthylketon	0,71	0,74	0,82	0,77
Methylisopropylketon	0,78	0,78	0,85	0,84
Methylisohexylketon	0,79	0,83	0,86	

Papier: *Schleicher & Schüll* 2043b mgl, senkrecht zur Faserrichtung

$T = 17°$

Methode: absteigend

Die Lösungsmittelgemische A—C sind zunächst ohne Essigsäurezusatz in den verschiedensten Mischungsverhältnissen geprüft worden. Dabei zeigt sich, daß das Mischungsverhältnis Cyclohexan-Alkohol-Wasser 3 : 6 : 1 (Volumenteile) die besten Trennungen ergibt. Durch Erhöhung des Cyclohexangehaltes werden die R_f-Werte größer und damit die Trennungen weniger scharf, während ein Wasserzusatz zu Flecken mit Schwänzen führt. Trotz der guten Trennwirkung, die mit dem Lösungsmittelgemisch erhalten wird, sind die Flecken wenig diskret. Es ist daher durch Imprägnierung des Papiers mit 2%iger Lösung von sek. Natriumphosphat versucht worden, bessere Ergebnisse zu erhalten. Aber auch dieses Verfahren hat zu keinem Erfolg geführt. Erst durch Zusatz von Essigsäure zum Lösungsmittelgemisch und Verwendung des Papiers senkrecht zur Faserrichtung entstehen scharfe Flecken, die außerdem kleinere R_f-Werte zeigen (s. Tab. 2).

Bei der Papierchromatographie der 2,4-Dinitrophenylhydrazone läuft das Reagens 2,4-Dinitrophenylhydrazin praktisch nicht mit. Deshalb kann die auf aliphatische Carbonylverbindungen zu prüfende und mit dem Reagens versetzte alkoholische Lösung direkt verwendet werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, die 2,4-Dinitrophenylhydrazone mit Petroläther auszuschütteln, von dem das 2,4-Dinitrophenylhydrazin nicht aufgenommen wird.

Tabelle 2

Einfluß des Essigsäurezusatzes zum Lösungsmittelgemisch B auf die R_f-Werte der 2,4-Dinitrophenylhydrazone

2,4-Dinitrophenylhydrazon vom	R_f-Werte Lösungsmittelgemisch B (ohne)	B (mit)
Formaldehyd	0,52	0,42
Acetaldehyd	0,64	0,55
Propionaldehyd	0,75	0,66
n-Butyraldehyd	0,80	0,73
Isobutyraldehyd	0,80	0,75
Isovaleraldehyd	0,82	0,78
n-Önanthaldehyd	0,86	0,82
Crotonaldehyd	0,73	0,64
Aceton	0,73	0,66
Methyläthylketon	0,80	0,74
Methylisopropylketon	0,84	0,78
Methylisohexylketon	0,85	0,83

B (ohne): Cyclohexan-Äthanol-Wasser 3 : 6 : 1 (Volumenteile)
B (mit): Cyclohexan-Äthanol-Essigsäure-Wasser 6 : 12 : 1 : 2 Volumenteile)
Papier: *Schleicher & Schüll* 2043b mgl. senkrecht zur Faserrichtung
T = 17°
Methode: absteigend

Versuche, mit diesen Lösungsmittelgemischen aromatische Aldehyde und Ketone (2,4-Dinitrophenylhydrazon des Benzaldehyds und des Acetophenons) zu chromatographieren, waren ohne Erfolg. Nur die 2,4-Dinitrophenylhydrazone des Cyclohexanons zeigten scharfe Flecken mit definierten R_f-Werten (s. Tab. 3).

Tabelle 3

R_f-Werte des Cyclohexanons und Methylcyclohexanons

2,4-Dinitrophenylhydrazon vom	R_f-Werte Lösungsmittelgemisch A	B	C	D
Cyclohexanon	0,72	0,78	0,81	0,81
Methylcyclohexanon	0,80	0,82	0,86	0,85

Papier: *Schleicher & Schüll* 2043b mgl. senkrecht zur Faserrichtung
T = 17°
Methode: absteigend

Auch auf Silikonpapier wurde versucht, die 2,4-Dinitrophenylhydrazone aliphatischer Carbonylverbindungen zu chromatographieren. Verwendet wurden als Lösungsmittelgemische Benzin (55—70°)-Isopropanol-Wasser 5 : 5 : 2 (Volumenteile) und Testbenzin-(100-115°)-Isopropanol-Wasser im Volumenverhältnis 5 : 5 : 0,6 in denen, wie Reagenzglasversuche zeigten, Verteilungen zustande kamen. Die

Trennungen waren aber nicht sehr scharf und die Flecken sehr verwaschen, so daß auf eine eingehendere Prüfung der Papierchromatographie auf Silikonpapier verzichtet wurde.

Bei den Versuchen sind die R_f-Werte verschiedener Vertreter der homologen Reihe aliphatischer Aldehyde bestimmt worden. Da nun nach *Martin*[10]) sowie *Bate-Smith* und *Westall*[11]) die Werte der Funktion $R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right)$ proportional der Kohlenstoffanzahl der Glieder einer homologen Reihe sind, ist dieser Zusammenhang überprüft worden. Wie aus Abb. 1 hervorgeht weichen die R_M-Werte erheblich vom linearen Verlauf ab. Das trifft für die R_M-Werte aller angewandten Lösungsgemische zu, die ausgesprochene 2-Phasensysteme sind. Nur für die ersten 4 Glieder der homologen Reihe ist der Verlauf der Kurve nahezu geradlinig. *Bate-Shmith* und *Westall* haben bei ihren Versuchen immer nur 4 Glieder der homologen Reihen von aromatischen Carbonsäuren, Anthocyanidinen und Aminosäuren geprüft und sind vielleicht daher auf ein eventuell abweichendes Verhalten der höheren Glieder nicht aufmerksam geworden. Tatsächlich hat auch *Kalbe*[12]) bei Monocarbonsäuren von C_1 bis C_{11} und bei Dicarbonsäuren von C_2 bis C_{12} und unter Verwendung verschiedener Lösungsmittelgemische Abweichungen vom linearen Verlauf beobachtet. Nur die Papierchromatographie der normalen Dicarbonsäuren unter Verwendung von n-Propanol-Ammoniumcarbonat-Pufferlösung (1,5n-Ammoniumcarbonat in 3,0n-Ammoniak) im Volumenverhältnis 3 : 1 liefert R_f-Werte, deren R_M-Werte proportional der Anzahl Kohlenstoffatome der Dicarbonsäuren sind. So treffen also auch für die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Aldehyde und den angegebenen Lösungsmittelgemischen die vereinfachten Beziehungen nicht zu.

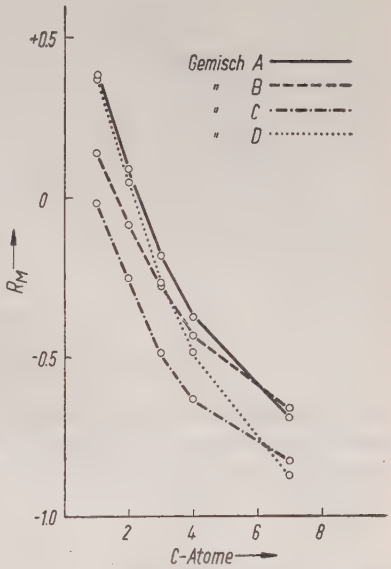


Abb. 1. Abhängigkeit der R_M-Werte der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der normalen Aldehyde von der Anzahl der Kohlenstoffatome. Lösungsmittelgemisch A—D.

Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der R_f-Werte von der Anzahl der Kohlenstoffatome der normalen Aldehyde.

Auch quantitativ ist das papierchromatographische Verhalten der Flecken der 2,4-Dinitrophenylhydrazone aliphatischer Aldehyde und Ketone geprüft worden.

[10]) Biochem. Soc. Symposia *3*, 4 (1949).
[11]) Biochim. biophysica Acta *4*, 427 (1950).
[12]) *Hoppe-Seyler*'s Z. physiol. Chem. *297*, 19 (1954).

Dabei lag der Gedanke nahe, die 2,4-Dinitrophenylhydrazone mit Alkohol vom Papier abzulösen und in diesen Farblösungen die Extinktionen zu bestimmen. Sind die Eichkurven für die entsprechenden 2,4-Dinitrophenylhydrazone Gerade, so ist damit die Voraussetzung für eine Berechnung der Konzentrationen der zu bestimmenden Stoffe gegeben.

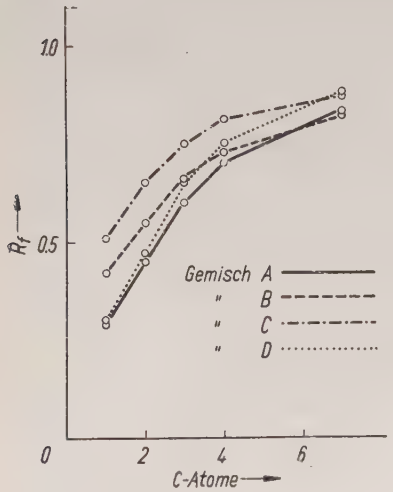


Abb. 2. R_f-Werte der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der normalen Aldehyde in Abhängigkeit von der Anzahl der Kohlenstoffatome. Lösungsmittel A—D.

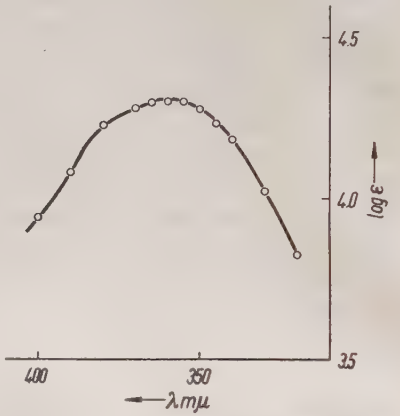


Abb. 3. Farbkurve vom 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Acetons in Äthanol- (Unicam SP 500)

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren sind analysenreine 2,4-Dinitrophenylhydrazone verwendet worden, die, wie im experimentellen Teil beschrieben, dargestellt, 5mal aus carbonylfreiem Äthanol umkristallisiert und 5 Stunden im Vakuum bei 78° getrocknet worden waren. Tabelle 4 gibt die Schmelzpunkte der einzelnen Verbindungen wieder, und Abb. 3 zeigt als Beispiel eine Farbkurve des 2,4-Dinitrophenylhydrazons des Acetons.

Aus den ermittelten Absorptionsspektren geht hervor, daß die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der untersuchten Aldehyde und Ketone ein Maximum im Gebiet von 360 mμ haben. Ausnahmen machen das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Formaldehyds, dessen Maximum bei 350 mμ liegt und das des Crotonaldehyds mit einem Maximum bei 375 mμ. Weiterhin zeigt sich, daß die Extinktion bei gleicher Schichtdicke im Bereich von 0,015—1,25 der Konzentration direkt proportional und somit das *Lambert-Beer*sche Gesetz erfüllt ist. Die Eichgeraden laufen durch den Nullpunkt. Aus Tabelle 5 sind die entsprechenden λ_{max} und ihre log ε-Werte zu ersehen. Außerdem sind die Eichfaktoren zur Errechnung der Konzentrationen in mg/l für das Maximum angegeben. Die Eichfaktoren stellen Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen dar.

Tabelle 4

2,4-Dinitrophenylhydrazon vom	Schmp. nach *Kofler*	Farbe des Kristallisats aus Äthanol
Formaldehyd	168°	gelbbraun
Acetaldehyd	148°	gelb
Propionaldehyd	156°	orange
n-Butyraldehyd	122,3°	gelb
Isobutyraldehyd	182,5°	gelb
Isovaleraldehyd	123,5°	gelb
n-Önanthaldehyd	106,5°	zitronengelb
Crotonaldehyd	188°	rotviolett
Aceton	128°	hellbraun
Diäthylketon	155°	orangerot
Diisopropylketon	93°	orangerot
Methyläthylketon	115°	orange
Methylisopropylketon	118°	gelbbraun
Methylisohexylketon	77°	gelbbraun
Cyclohexanon	160°	gelb
Methylcyclohexanon	126,5°	gelb

Tabelle 5

Molekulargewichte, λ_{max}, log ε-Werte und Eichfaktoren der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Aldehyden und Ketonen

2,4-Dinitrophenylhydrazon vom	Molgewicht	λ_{max}	log ε	Eichfaktor für λ_{max} mg/l
Formaldehyd	210,2	350	4,29	10,5
Acetaldehyd	224,2	358	4,31	11,2
Propionaldehyd	238,2	359	4,32	11,4
n-Butyraldehyd	252,2	359	4,34	11,4
Isovaleraldehyd	266,3	359	4,33	12,3
n-Önanthaldehyd	294,3	359	4,33	13,7
Crotonaldehyd	250,2	375	4,46	8,7
Aceton	238,2	359	4,31	11,7
Diäthylketon	266,3	360	4,32	12,8
Diisopropylketon	294,3	361	4,35	13,2
Methyläthylketon	252,2	360	4,32	12,1
Methylisopropylketon	266,3	361	4,34	12,1
Cyclohexanon	278,3	363	4,33	12,9
Methylcyclohexanon	292,3	364	4,39	12,0

Aus vielen Versuchen geht nun hervor, daß mit den angegebenen Lösungsmittelgemischen die 2,4-Dinitrophenylhydrazone auf ihrem Weg nicht vom Papier adsorbiert werden. Weiterhin lassen sich die Flecken bequem mit Äthanol quantitativ ablösen. Das ist von wesentlicher Bedeutung, da die Messung der Extinktionen von Farbstoffmengen in Lösung genauer ist als auf dem Papier. Allerdings müssen

bei der Messung der Extinktionen die Leerwerte entsprechender Papierstücke berücksichtigt werden. So ist jede Messung gegen eine Lösung vorzunehmen, die in der entsprechenden Weise bereitet wird wie die Farblösung, nur mit einem gleich großen Leerstreifen (s. Beschreibung der Versuche). Aus zahlreichen Analysen geht hervor, daß der größte Fehler, der erhalten worden ist, 10% beträgt. Es ist verständlich, das dies dann der Fall ist, wenn es sich um Bestimmungen von Verbindungen handelt, deren R_f-Werte extrem nahe zusammenliegen. Im Durchschnitt betragen die Streuungen 1—5%. Zur genaueren Analyse ist zu empfehlen, in Verdünnungen zu arbeiten, die von jedem Stoff höchstens 20 γ enthalten, da größere Mengen Schwanzbildung hervorrufen, die bei Trennungen stören. Zweckmäßig werden die 2,4-Dinitrophenylhydrazone nicht als Punkte, sondern als Striche auf das Papier aufgetragen.

Tabelle 6 gibt als Beispiel das Ergebnis einer Probeanalyse wieder.

Tabelle 6

Ergebnis einer Analyse eines Gemisches

2,4-Dinitrophenylhydrazon vom	Einwaage mg	Gefunden mg	Fehler %
Acetaldehyd	2,6	2,5	— 3,8
Propionaldehyd	3,2	3,0	— 6,3
Aceton	4,1	4,2	+ 2,4
Diäthylketon	1,9	2,0	+ 5,2

Beschreibung der Versuche

Lösungsmittel

Benzin: frisch destilliert, Fraktion zwischen 55—70°.

Testbenzin: frisch destilliert, Fraktion zwischen 100—115°.

Cyclohexan: Original *Merck*.

Methanol, rein (*Merck*), Äthanol (Spiritus S vergällt mit Benzin), Propanol und Isopropanol werden von Carbonylverbindungen befreit: 1 Liter des entsprechenden Alkohols werden mit 10 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin und 5 ml konz. Salzsäure am Rückflußkühler etwa 1 Stunde lang gekocht. Anschließend wird über eine Füllkörperkolonne von 50 cm destilliert, wobei von der Gesamtmenge 100 ml Vorlauf und 100 ml Rückstand verworfen werden.

Dioxan: Man erhitzt 5 Stunden lang mit festem granulierten Kaliumhydroxyd am Rückflußkühler und fraktioniert anschließend (Kp = 100,8°).

Essigsäure: 98/100% *Knapsack*-Griesheim A. G.

Papiere

Schleicher & Schüll 2043b mgl.

Silikonpapier Reagentia, Frankfurt/M. 2043b mgl hy.

Lösungsmittelgemische

Sie werden vor Beginn jedes Versuches neu bereitet. Für die verwendete Glaskammer (60 × 60 × 20 cm) sind erforderlich: Cyclohexan 300 ml, Alkohol 600 ml, Essigsäure 50 ml und Wasser 100 ml. Wird Methanol als Komponente verwendet, so erhält man etwa 280 ml Oberphase, bei Äthanol 250 ml.

Vom Lösungsmittelgemisch D sind für die erwähnte Glaskammer erforderlich: Benzin (55—70°) 300 ml, Methanol 600 ml, Essigsäure 100 ml und Wasser 100 ml.

Aldehyde

Soweit sie nicht zur Verfügung standen, wurden sie (Propionaldehyd, n-Butyraldehyd, Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd, n-Önanthaldehyd) durch Eintropfen einer 5%igen Chromsäurelösung in Essigsäure in den entsprechenden siedenden, zuvor fraktionierten Alkohol dargestellt. Der Aldehyd findet sich neben dem Alkohol und sauren Anteilen im Destillat.

Ketone

Soweit nicht vorhanden, sind sie (Diäthylketon, Diisopropylketon, Methylisopropylketon) nach der klassischen Methode durch trockene Destillation der entsprechenden Kalziumsalze nach *Münch*[13]) dargestellt worden.

Methylisohexylketon wird nach *Windaus* und *Resau* (l. c.) aus Cholesterin erhalten.

2,4-Dinitrophenylhydrazone der

a) Aldehyde: Zu ihrer Darstellung werden jeweils etwa 5%ige äthanolische Lösungen (Äthanol frei von Carbonylverbindungen) der reinen Aldehyde bzw. die oben erhaltenen Destillate mit einer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung[14]) versetzt. Ein Überschuß an Reagenzlösung ist zu vermeiden. Man läßt über Nacht stehen, saugt dann den Kristallbrei ab, wäscht ihn mit verd. Äthanol aus und kristallisiert ihn fünfmal aus Äthanol um.

b) Ketone: Die entsprechenden Ketone bzw. durch Feinfraktionierung erhaltenen Destillate (s. oben) werden im Verhältnis 1 : 20 mit Äthanol (frei von Carbonylverbindungen) verdünnt und mit der 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (s. oben) versetzt. Der Kristallbrei wird, wie bei den Aldehyden beschrieben, aufgearbeitet.

Die so hergestellten 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Aldehyde und Ketone waren papierchromatographisch einheitlich und zeigten nahezu die gleichen Schmelzpunkte, wie sie in der Literatur beschrieben sind.

Die Chromatogramme

Die Papiere werden senkrecht zur Faserrichtung verwendet. Im Abstand von 5 cm vom Papierrand wird der Bogen umgeknickt und kann hier auf den Rand der Wanne gehängt werden. Der überhängende Teil wird in der Wanne mit ein paar Glasstäben beschwert. Weitere 2 cm vom Knick entfernt, werden im Abstand von je 3 cm die 2,4-Dinitrophenylhydrazone als 1 cm lange Striche aufgetragen. Dies geschieht durch Nebeneinandersetzen kleinster Tropfen der zu untersuchenden Lösung mittels einer Blutpipette.

Die Lösungen sollen von jedem Bestandteil nicht mehr als 20 γ enthalten. Das Trocknen der Papierchromatogramme erfolgt im Trockenschrank bei einer Temperatur von höchstens 50°. Die Flecken sind gut zu erkennen.

Das absteigende Verfahren

Zur absteigenden Papierchromatographie werden Ganzglaskammern mit den Ausmaßen 60 × 60 × 20 cm verwendet. Das Lösungsmittelgemisch wird einige Tage vorher bereitet und durch wiederholtes Umschütteln auf die Temperatur des Arbeitsraumes gebracht. Dann wird die Kammer mit der unteren Phase des Lösungsmittelgemisches 48 Stunden lang gesättigt. Nach dieser Zeit wird der Bogen in die Kammer gehängt, 12 Stunden lang zur Sättigung sich selbst überlassen und dann erst die obere Phase durch einen Tropftrichter eingeführt. Die Kammer muß sorgfältig gegen Verdunsten des sehr empfindlichen Lösungsmittelgemisches verschlossen sein. Die Laufzeit beträgt für die Gemische A, B und D 12 Stunden, für das Gemisch C 30 Stunden.

---

[13]) Liebigs Ann. Chem. *180*, 327 (1876).

[14]) 50,0 2,4-Dinitrophenylhydrazin werden in 600 ml 85%ige Phosphorsäure in einem 1-Liter fassenden Becherglas auf dem Wasserbad gelöst. Die Lösung wird mit 395 ml 95%igem Äthanol verdünnt und filtriert; vgl. *Houben-Weyl*, Methoden der org. Chemie 4. Aufl., Verlag Gg. Thieme, Stuttgart.

Quantitative Bestimmung

Die auf aliphatische Aldehyde und Ketone zu untersuchende alkoholische Lösung wird mit einem geringen Überschuß an 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (s. oben) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Sodann verdünnt man sie auf ein bestimmtes Volumen mit Äthanol. Von dieser Lösung wird mit einer geeichten Blutpipette eine bestimmte Menge aufgetragen. Für jede Bestimmung verwendet man zweckmäßig Einzelstreifen. Nach der Verteilung auf dem Papier und Trocknung werden die Flecken als Rechtecke und zu jedem Rechteck entsprechend große Leerstücke ausgeschnitten. Jedes Papierstück bringt man in ein Reagenzglas und übergießt es mit genau 5 ml Äthanol. Die Gläser werden verschlossen und etwa 2 Stunden stehengelassen. Nach dieser Zeit werden die Extinktionen der Farblösungen gegen die Blindlösungen gemessen:

$$\text{mg/l} = \text{Faktor}^{*}) \cdot \frac{\text{Extinktion}}{\text{Schichtdicke}}$$

Schließlich hat man noch diesen Wert auf die entsprechende Carbonylverbindung umzurechnen.

*) Siehe Tabelle 5.

DG 500/246/55-III-18-127

L e b e n s l a u f

Am 26.Juni 1910 wurde ich,Paul Erich T u n m a n n ,als Sohn des verstorbenen ord.Universitätsprofessors Dr.Otto Tunmann zu Wien,in Bern/Schweiz geboren.Meine ersten Schuljahre verbrachte ich in meiner Geburtsstadt.Dann besuchte ich das Realgymnasium in Gera und legte 1930 die Reifeprüfung in Weida ab.Von 1930-1932 war ich Praktikant in der Hofapotheke in Greussen/Thür.und bestand im Frühjahr 1932 das pharmazeutische Vorexamen in Weimar.1932-1934 war ich Apothekerassistent in der Löwenapotheke in Greiz. Das pharmazeutische Studium begann ich im S.S.1934 an der Universität Königsberg.Zum Wintersemester 1934/35 ging ich nach Erlangen,wo ich im Frühjahr 1936 das pharmazeutische Staatsexamen ablegte.Dann widmete ich mich dem Studium der Chemie und Lebensmittelchemie.1938 legte ich die Diplomchemiker-Hauptprüfung und 1940 das nahrungsmittelchemische Staatsexamen ab.Mit einer Arbeit über "Beiträge zur Analyse organischer Arzneimittel" promovierte ich 1939.
Seit 1938 war ich wissenschaftlicher Assistent am Institut für angewandte Chemie der Universität Erlangen.Im Jahre 1940 wurde ich zur Wehrmacht eingezogen.Seit 1951 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg tätig.